

Imunofenotipizacijski profil infekcijske mononukleoze uzrokovane Epstein-Barr virusom

Mateljak, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:708274>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nives Mateljak

Imunofenotipizacijski profil infekcijske mononukleoze uzrokovane Epstein-Barr
virusom

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

»Ovaj rad, izrađen u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Odsjek za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku, pod mentorstvom dr. sc. Ivane Grgić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.«

Dr. sc. Ivani Grgić najljepše hvala na iskazanom povjerenju, strpljenju, stručnim savjetima i danoj mogućnosti da izradim diplomski rad u željenom laboratoriju.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Gordani Lacković-Venturin, dr. sc. Lani Gorenec i dr. sc. Snježani Židovec Lepej na pomoći i susretljivosti prilikom izrade diplomskog rada.

Svim članovima Odjela za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku zahvaljujem na pomoći i vremenu.

Posebnu zahvalnost iskazujem svim mojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

Najveću zaslugu za sve što sam postigla pripisujem mojim roditeljima i posebno hvala na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci što mi je pružaju cijeli život. Veliko hvala i ostalim članovima obitelji koji su uvijek vjerovali u mene.

I na kraju, veliko hvala mojoj sestri Gabi na razumijevanju i podršci, veselju zbog svakog položenog ispita i ohrabrenju u trenucima nesigurnosti.

Nives

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Imunofenotipizacijski profil infekcijske mononukleoze uzrokovane Epstein-Barr virusom

NIVES MATELJAK

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb

Infekcijska mononukleoza uzrokovana virusom Epstein-Barr (EBV) u većine imunokompetentnih domaćina je samoograničavajuća infekcija koja se najčešće prenosi kapljicama slina zaražene osobe. U akutnoj fazi EBV zaražava epitelne stanice orofarinksa, a zatim limfocite B koje uništavaju citotoksični limfociti T. Nakon akutne faze, slijedi doživotna latentna infekcija. Različite subpopulacije limfocita na svojoj površini ekspimiraju velik broj specifičnih biljega koji omogućuju njihovu identifikaciju. Protočnom citometrijom određuje se apsolutni broj i postotak pojedinih staničnih subpopulacija te prepoznaju patološke promjene stanične imunosti što čini imunofenotipizacijski profil. U ovo istraživanje bili su uključeni ispitanici s kliničkom dijagnozom infekcijske mononukleoze uzrokovane EBV-om. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti imunofenotipizacijski profil ispitanika s dijagnozom infekcijske mononukleoze protočnom citometrijom periferne krvi. Ispitanicima su se odredili postoci pojedinih limfocitnih subpopulacija periferne krvi: limfocita T, limfocita B, NK-stanica, CD4⁺ limfocita T, CD8⁺ limfocita T, aktiviranih CD8⁺CD38⁺ i HLA-DR⁺ limfocita T i zatim usporedili s referentnim vrijednostima za zdrave osobe. Zabilježeni su statistički značajno veći postoci ukupnih limfocita T, CD8⁺ limfocita T, aktiviranih CD8⁺CD38⁺ i HLA-DR⁺ limfocita T. Postoci CD4⁺ limfocita T i limfocita B statistički su značajno smanjeni. Apsolutni broj CD4⁺ limfocita T te postotak stanica NK ne pokazuju statistički značajna odstupanja od referentnih vrijednosti.

(42 stranice, 9 slika, 4 tablice, 64 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: limfocitne subpopulacije periferne krvi, protočna citometrija

Voditelj: Dr. sc. Ivana Grgić, znanstvena suradnica

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, redoviti profesor

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Dijana Škorić, izvanredni profesor

Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, redoviti profesor

Doc. dr. sc. Zoran Tadić, docent

Rad prihvaćen: 18. veljače 2016. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Immunophenotyping profile of infectious mononucleosis caused by

Epstein-Barr virus

NIVES MATELJAK

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Infectious mononucleosis caused by the Epstein-Barr virus (EBV) is a self-limiting infection in most immunocompetent hosts that is commonly transmitted by droplets of saliva from infected person. During the acute phase, EBV infects oropharyngeal epithelial cells and B-lymphocytes which are destroyed by cytotoxic T-lymphocytes. Acute phase is followed by a lifelong latent infection. Different cell subsets express on its surface a large number of specific markers which enables their identification. Flow cytometry analyzes the number and ratio of specific cell subpopulations and recognizes the pathological changes of cellular immunity which presents immunophenotypic profile. This study included subjects with a clinical diagnosis of infectious mononucleosis caused by EBV. The aim of this study was to determine immunophenotypic profile of patients with a clinical diagnosis of infectious mononucleosis using flow cytometry. Percentages of certain lymphocyte subpopulations of peripheral blood; T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, activated CD8+CD38+ i HLA-DR T lymphocytes were determined for all patients in this study and then compared with reference values for healthy individuals. Patients with EBV-induced infectious mononucleosis showed significantly increased percentages of total T lymphocytes, cytotoxic CD8+ T lymphocytes and activated CD8+CD38+ and HLA-DR+ T lymphocytes compared to reference values. Percentages of CD4+ T lymphocytes, as well as B lymphocytes, were significantly decreased. Absolute numbers of CD4+ T lymphocytes and percentages of NK cells did not show a statistically significant difference from the reference values.

(42 pages, 9 figures, 4 tables, 64 references, original in: Croatian)

Thesis stored in the Central Biological Library

Key words: periferal blood lymphocyte subpopulations, flow cytometry

Supervisor: Res. Assoc. Ivana Grgić, PhD

Co-supervisor: Prof. Gordana Lacković-Venturin, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Dijana Škorić, PhD

Prof. Gordana Lacković-Venturin, PhD

Asst. Prof. Zoran Tadić, PhD

Thesis accepted: February 18, 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Imunosni sustav	1
1.2. Dijelovi imunosnog sustava.....	2
1.2.1. Limfni organi.....	2
1.2.2. Stanice.....	2
1.2.3. Molekule i geni	5
1.3. Virus Epstein-Barr.....	8
1.4. Struktura i genom EBV-a.....	9
1.5. Životni ciklus EBV-a.....	11
1.6. Imunopatogeneza infekcije EBV-om.....	12
1.7. Dijagnostika i liječenje infekcije EBV-om	13
1.8. Protočna citometrija.....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Ispitanici	20
3.2. Biološki uzorci.....	20
3.3. Reagensi i otopine za protočnu citometriju.....	20
3.4. Oprema, računalni programi i potrošni materijal.....	21
3.5. Metode.....	21
3.5.1. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi.....	21
3.6. Statističke metode	23
4. REZULTATI	24
4.1. Podaci o ispitanicima	24
4.2. Rezultati imunofenotipizacijskog profila limfocita periferne krvi ispitanika	24
4.2.1. Histogrami.....	24
4.2.2. Imunofenotipizacijski profil limfocita periferne krvi ispitanika - statistička analiza... 28	
5. RASPRAVA.....	30
6. ZAKLJUČCI.....	34
7. LITERATURA.....	35
8. ŽIVOTOPIS.....	42

1. UVOD

1.1. Imunosni sustav

Imunologija je biomedicinska znanost koja proučava imunost, tj. sposobnost organizma da se odupre djelovanju stranih tvari (antigena). Antigeni su složene molekule što ih imunosti sustav prepoznaje kao strane. Temeljna uloga imunosti sustava je obrana od infekcije, obrana od tumora i održavanje antigenske i genske homeostaze organizma. Dva temeljna mehanizma obrane organizma od štetnih tvari su nespecifični (urođeni) i specifični (stečeni). Nespecifična (urođena) imunost predstavlja prvu liniju obrane organizma od stranoga i neovisna je o antigenu, ali njome potaknuta reagira brzo. Uključuje anatomske, fiziološke, stanične i upalne zapreke (Kindt i sur., 2007). Anatomske zapreke su fizička i kemijska obrana koju čine koža i sluznice. Fiziološke zapreke prepoznaju patogene i djeluju kao izvršne molekule: sustav komplementa, interferon α i β , bjelančevine akutne faze upale – C-reaktivni protein, lizozim, β -lizin te prirodna protutijela koja proizvode limfociti B1 bez vidljiva dodira s određenim antigenima. Stanične se zapreke temelje na djelovanju fagocitnih stanica: mononuklearnih fagocita (makrofagi, neutrofil, eozinofili) i polimorfonuklearnih leukocita – urođeno ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*, NK stanice) (Andreis i sur., 2010).

Specifična (stečena) imunost se stječe u izravnom doticaju s antigenom, a njeni posrednici djeluju usmjerenom i specifično protiv antigena koji je narušio cjelovitost organizma. Sekundarna reakcija nastaje brže i učinkovitija je u odstranjivanju antigena. Temeljni princip mehanizma imunosti reakcije čine sposobnost prepoznavanja, specifičnost i pamćenje, što je pod kontrolom gena glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. *Major histocompatibility complex*, MHC). U stečenom imunološkom odgovoru, antigen-specifični limfociti proliferiraju i diferenciraju u klonove efektorskih limfocita koji eliminiraju patogen (Murphy i sur., 2012). Na temelju efektorskih mehanizama razlikujemo dva oblika specifične imunosti: humoralnu imunost (posredovanu protutijelima) i staničnu imunost (posredovanu stanicama). Humoralna imunost nastaje nakon podražaja limfocita B antigenom, uz pomoć pomoćničkih limfocita T. Diferencijacijom nastaju plazma-stanice koje izlučuju protutijela koja pomažu u uklanjanju antigena. Stanična imunost nastaje u reakciji organizma na mikroorganizme koji žive u stanicama, na kemijski izmijenjene vlastite stanice, na presatke tkiva i organa i na zloćudne tumore. U staničnom tipu imunosti pomoćnički limfociti T stimulirani prepoznatim antigenom, otpuštaju u svoj okoliš interleukin 2, limfokin koji podražuje citotoksične

limfocite T. Stimulirani citotoksični limfociti T ubijaju promijenjene stanice vlastitog organizma – nositelje stranog antigena (Andreis i sur., 2010).

1.2. Dijelovi imunosnog sustava

1.2.1. Limfni organi

Imunosni sustav u kralježnjaka nije lokaliziran već se sastoji od limforetikularnih organa, stanica, molekula i gena. Primarni limfni organi (timus i koštana srž), imaju središnju ulogu u razvoju i kasnijem održavanju limfnog sustava. U njima pluripotentne matične stanice sazrijevaju u limfocite. Sekundarni limfni organi (limfni čvorovi, slezena i limfno tkivo sluznica) specijalizirani su za prikupljanje i koncentriranje antigena, odnosno za pokretanje specifične imunoreakcije (Andreis i sur., 2010).

1.2.2. Stanice

Stanice koje sudjeluju u imunoreakciji nastaju iz pluripotentnih krvotvornih matičnih stanica dvama diferencijacijskim putovima: diferencijacijskim putem limfopoeze, pri čemu nastaju sve vrste limfocita (limfociti T – pomoćnički, citotoksični, regulacijski, limfociti B i urođeno ubilačke stanice) i diferencijacijskim putem mijelopoeze, pri čemu nastaju fagociti, dendritične stanice i različite posredničke stanice (Kindt i sur., 2007). Fagociti (neutrofilni i eozinofilni granulociti, predočne stanice, makrofagi) proždiranjem stranih čestica (fagocitozom) sudjeluju u nespecifičnoj obrani organizma. Uz to, oni prerađuju antigen, predočuju ga limfocitima, a uključuju se i u izvršnu fazu specifične imunoreakcije. Predočne stanice imaju zadaću da na svojoj membrani izlože antigen i time omoguće limfocitima T njegovo prepoznavanje. Stanice koje predočuju antigene pomagačkim limfocitima T nazivaju se profesionalne predočne stanice i dijele se na tri glavne skupine: dendritične stanice, makrofage i limfocite B. Tu zadaću ostvaruju tako što hvataju i upijaju antigene, razgrađuju ih u svojim endosomima na male peptide, vežu za vlastite molekule MHC-II i potom prenose na površinu stanice (Andreis i sur., 2010). Dendritične stanice predočuju antigene mikroorganizama, uključujući gljivice, bakterije i viruse, a posebice su važne u predočavanju virusnih antigena koji ne potiču kostimulacijsku aktivnost drugih predočnih stanica. Vezanjem za različite membranske receptore virus, nakon što prodre u stanicu, koristi

biosintetičke mehanizme zaražene stanice za sintezu virusnih bjelančevina. Citosolne proteaze razgrađuju virusne bjelančevine, a virusni peptidi se predočuju u sklopu molekula MHC-I. Za razliku od zrelih, nezrele dendritične stanice mogu hvatati viruse fagocitozom i mikropinocitozom, prerađivati virusne bjelančevine i predočivati virusne peptide u sklopu molekula MHC-II. Stoga dendritične stanice mogu predočavati velik broj virusnih antigena u sklopu molekula MHC-I i MHC-II, pa podražuju i pomoćničke i citotoksične limfocite T (Reis e Sousa, 2004). Makrofagi predočuju antigene podrijetlom od fagocitiranih čestica i mikroba. Fagocitoza u makrofagima potiče sintezu molekula MHC-II i kostimulacijskih molekula i tako aktivirani makrofagi postaju prave predočne stanice. Limfociti B kao predočne stanice učinkovito predočuju topljive antigene, koje vežu specifičnim imunoglobulinskim receptorom. Taj kompleks antigena i imunoglobulinskog receptora limfocit B upije, razgradi na peptide u endosomima i predoči na svojoj površini u sklopu molekula MHC-II. Limfociti T prepoznaju kompleks peptida i molekula MHC, aktiviraju se i luče citokine koji u povratnoj vezi potiču sazrijevanje limfocita B i proizvodnju protutijela (Andreis i sur., 2010). Posredničke stanice (bazofilni leukociti, mastociti) izlučuju različite topljive tvari (posrednike ili medijatore) kojima pojačavaju upalu, a sudjeluju i kao izvršne stanice u nekim oblicima specifične imunoreakcije (npr. u reakciji na parazite ili u alergijskim reakcijama).

Limfociti su središnje stanice u specifičnoj imunoreakciji. Na temelju funkcije i površinskih biljega razlikuju se tri populacije limfocita: limfociti B, limfociti T i urođeno ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*, stanice NK). Limfociti sadrže brojne površinske molekule - biljege na temelju kojih možemo razlikovati njihove pojedine skupine. Većina limfocitnih biljega svrstana je u CD-klasifikaciju (engl. *clusters of differentiation*) kako bi se kategorizirala monoklonska protutijela proizvedena na ljudske leukocitne antigene (engl. *human leukocyte differentiation antigens*, LDA). Pored CD-biljega, limfociti T i B izražavaju receptore za antigen. Antigenski receptor limfocita T (engl. *T-cell receptor*, TCR) je heterodimer građen od dva različita polipeptidna lanca. Izvanstanični dio svakog lanca razlikuje varijabilna regija, odgovorna za vezanje antigena i konstantna regija. Antigenski receptor limfocita B (engl. *B-cell receptor*, BCR) membranski je imunoglobulin. Receptor je složena molekula koja se sastoji od dva istovjetno teška i dva istovjetno laka lanca, a u njoj se razlikuju dva funkcijska dijela: dio odgovoran za vezanje antigena (Fab-ulomak) i dio koji nije specifičan za antigen (Fc-ulomak). BCR se od protutijela razlikuje samo po završnom dijelu teškog lanca kojim je vezan za membranu limfocita B (Andreis i sur., 2010).

Limfociti T sazrijevaju i diferenciraju se u timusu, nositelji su stanične imunosti. Njihova osnovna funkcija je prepoznati antigene koje im predočuju druge stanice imunskog sustava. Nakon prepoznavanja antigena, preko TCR-a, pomoćničke stanice luče citokine kojima potiču više različitih oblika imunskog odgovora, dok citotoksične stanice izravno uništavaju stanicu koja stvara strane antigene (Abbas i sur., 2000, Andreis i sur., 2010). Sazrijevanjem limfocita dolazi do promjena u izražavanju biljega na površini stanice. Najvažniji površinski biljezi timocitne populacije su T-signalna molekula CD3 i koreceptorske molekule CD4 i CD8 (Murphy i sur., 2012). S obzirom na različite površinske biljege dobivene procesom sazrijevanja razlikuju se pomoćnički, citotoksični i regulacijski limfociti T. Pomoćnički limfociti T pomažu limfocitima B u proizvodnji protutijela na antigene ovisne o timusu te potiču sazrijevanje precitotoksičnih limfocita T stimuliranih antigenom u citotoksične limfocite T. Na ljudskim pomoćničkim limfocitima T izražen je diferencijacijski biljeg CD4. Limfociti CD4⁺ prepoznaju tuđi antigen, tj. peptid vezan za molekulu MHC-II na membrani profesionalnih predočnih stanica. Citotoksični limfociti T se nakon dodira s antigenom diferenciraju u efektorske citotoksične limfocite T koji u izravnom dodiru razaraju ciljane stanice (vlastite stanice zaražene virusom i stanice transplantata ili tumora). Imaju izražen diferencijacijski biljeg CD8 (Andreis i sur., 2010). Aktivirani limfociti CD8⁺ eliminiraju virusom zaražene stanice, koje predočavajući na svojoj površini peptide nastale iz staničnih viralnih proteina, označe same sebe kao metu. Također, aktivirani limfociti CD8⁺ luče brojne citokine uključujući interferon- γ (IFN- γ) i čimbenik tumorske nekroze (engl. *Tumor necrosis factor*, TNF- α) (Wiesel i sur., 2009). Imaju sposobnost liziranja ciljnih stanica, citotoksični su za aloantigene, te imaju pomoćnički i supresorski učinak na stvaranje protutijela od strane limfocita B. Potiču nastanak kasne upalne reakcije i reakciju transplantata protiv primatelja (engl. *graft versus host disease* – GvHD). Regulacijski limfociti T (Tr) izlučivanjem topljivih molekula potiskuju imunsku reakciju, pogotovo proizvodnju protutijela. Koče imunski odgovor djelujući na limfocite T ili izravno limfocite B (Andreis i sur., 2010).

Limfociti B sazrijevaju u koštanoj srži i nositelji su humoralne imunosti. Kada receptori antigena vezani za membranu limfocita B dođu u doticaj s antigenom aktiviraju niz procesa unutar stanice koji rezultiraju aktivnim stvaranjem protutijela (Abbas i sur., 2000). Imunoglobulini su specifični receptori za antigen (BCR). Većina ljudskih limfocita nosi membranski IgM i IgD, a manji broj imunoglobuline preostalih razreda: IgG, IgA i IgE. Limfociti B imaju izražene površinske biljege CD19, CD21 i CD81 koji čine B-stanični

koreceptorski kompleks. Povezanost tih molekula s receptorom osigurava dodatni signal za aktivaciju limfocita B (Andreis i sur., 2010).

Stanice NK (limfociti 0) imaju sposobnost ubijanja ciljnih stanica, ali nemaju izražene specifične receptore za antigen. Dio su urođene imunosti. S limfocitima T dijele adhezijsku molekulu CD2 (većina stanica NK) i biljeg CD8 (oko 50% stanica NK). Od površinskih biljega obilježava ih prvenstveno prisutnost biljega CD16 (receptor za Fc fragment IgG, FcγRIII) i CD56 (neuralna adhezijsku molekulu, N-CAM). Glavna funkcija stanica NK jest izlučivanje citokina kojima reguliraju upalni odgovor na zarazu i razaranje vlastitih promijenjenih stanica (Murphy i sur., 2012).

1.2.3. Molekule i geni

Najvažnije molekule i geni uključeni u složene mehanizme specifične imunosti su imunoglobulini, antigenski receptori limfocita T, glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (MHC), limfocitni biljezi CD, sustav komplementa te posrednici stanične imunosti i anafilaktičke preosjetljivosti. Jaki antigeni tkivne podudarnosti određeni su kompleksom polimorfnih gena. Ti su geni nazvani MHC, a njihovi produkti molekule MHC. Molekule MHC skupine I građene su od jednog α -lanca i jednog β_2 lanca. Pri prepoznavanju tuđih antigena, citotoksični (CD8) limfociti T prepoznaju molekule MHC skupine I vlastita organizma. Molekule MHC skupine II. građene su od jednog α -lanca i β -lanca. Pri prepoznavanju tuđih antigena, pomoćnički (CD4) limfociti T prepoznaju molekule MHC skupine II vlastita organizma (Andreis i sur., 2010). Geni MHC čine kompleks na kratkom kraku 6. kromosoma. Dijele se u tri funkcionalne skupine, od kojih skupine I i II kodiraju klasične molekule MHC. U čovjeka se taj sustav naziva HLA (prema engl. *Human Leukocyte Antigens*), pa skupinu I čine geni HLA-A, HLA-B i HLA-C, a skupinu II HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR (Murphy i sur., 2012). Polimorfizam (raznolikost alelnih oblika) i poligenija (veći broj gena u haplotipu) važne su značajke sustava gena MHC. Regulacija izražaja molekula MHC zbiva se na razini prepisivanja gena. Antigeni MHC-I predočuju ulomke tuđih antigena limfocitima T CD8⁺, a MHC-II limfocitima T CD4⁺ (Andreis i sur., 2010). Diferencijacijski biljezi CD (engl. *clusters of differentiation*) skupine su površinskih molekula na limfocitima i drugim stanicama koje imaju različite biološke funkcije. Često igraju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji djelujući kao receptori ili ligandi (molekule koje aktiviraju receptore) te kao signalne i adhezijske molekule limfocita koje omogućuju prijanjanje (adheziju) za druge

limfocite i predočne stanice (Zola i sur., 2007). Molekula CD45 predstavlja leukocitni zajednički antigen koja se nalazi u membrani svih leukocita (panleukocitni biljeg) i djeluje kao transmembranska tirozin-fosfataza (Altin i Sloan, 1997). Molekula CD38 je multifunkcionalni enzim kojeg na svojoj površini ekprimiraju aktivirani limfociti T, limfociti B, stanice NK, granulociti, monociti/makrofagi i dendritičke stanice (Fedele i sur., 2004). CD38 na imunosnim stanicama djeluje kao signalna molekula, prenoseći aktivacijski signal limfocitima T i limfocitima B kao i stanicama NK i monocitima, što rezultira povećanom produkcijom i sekrecijom citokina (Morra i Malavasi, 1998) i pojačavanjem citotoksičnog odgovora (Deaglio i sur., 2002). Diferencijacijski biljezi CD mogu se odrediti monoklonskim protutijelima, što omogućuje razlikovanje pojedinih limfocitnih populacija. Svaka CD-skupina označena je rednim brojem, tradicionalnim nazivom za biljeg, odnosno protutijelo, funkcijom CD-biljega (ako je poznata), izražajem biljega na krvotvornim i drugim stanicama, kao i poznatim ligandima za određeni CD-biljeg. (Tablica 1.) (Murphy i sur., 2012)

Tablica 1. Popis CD-biljega izraženih na različitim limfocitnim subpopulacijama u perifernoj krvi čovjeka (Murphy i sur., 2012).

CD	Sinonim	Funkcija	Izražaj	Ligand
CD3	signalna molekula TCR	aktivacija limfocita T	timociti, limfociti T	-
CD4	T4, L3T4	koreceptor limfocita T	timociti, limfociti T (dio), monociti	MHC/HLA-II, HIV gp120
CD8	T8	koreceptor limfocita T	timociti (dio), limfociti T (dio)	MHC/HLA-I
CD19	B4	dio signalnog kompleksa BCR, aktivacija limfocita T	limfociti B, folikularna dendritična stanica	IgM, heparin
CD38	ADPRC 1, T10	adhezija, prijenos signala, aktivacija limfocita T	limfociti T i B, stanice NK, dendritične st., monociti/makrofagi	CD31, CD16, MHC/HLA-II
CD45	B220	signalizacija limfocita	svi leukociti	CD22
CD56	NCAM	adhezija	stanice NK, limfociti T (dio), mozak	CD56, heparan-sulfat

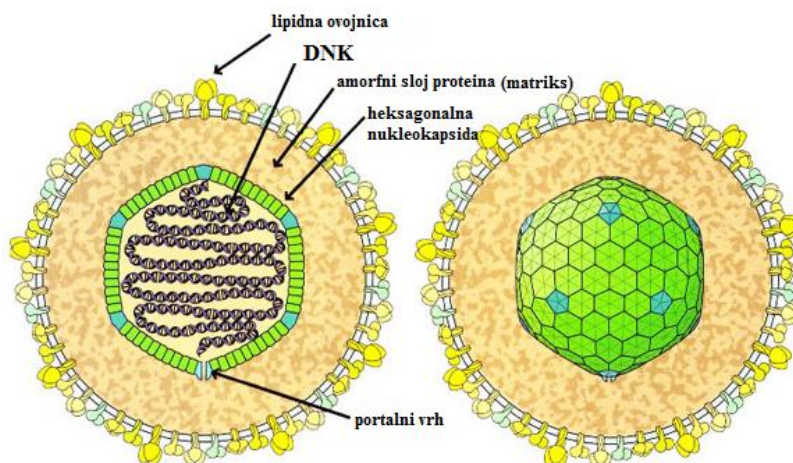
1.3. Virus Epstein-Barr

Virus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*, EBV) pripada porodici *Herpesviridae*, podporodici *Gammaherpesvirinae* i rodu *Lymphocryptovirus* (prema International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). EBV, poznat i kao ljudski herpes virus 4 (*Human herpes virus-4*, HHV-4) je gama herpesvirus kojeg su 1964. godine prvi put izolirali Epstein i suradnici iz kultiviranih stanica Burkittova limfoma (Epstein i sur., 1964). Suvremena virologija razlikuje dva genotipa virusa: EBV-1 i EBV-2 (A i B tip). Oba su tipa virusa rasprostranjena po čitavom svijetu, ali je tip 1 češći u Europi i Aziji, dok je tip 2 dominantan u Africi. Virusni genom čini linearna dvolančana molekula DNA. Homologija sekvence DNA između tipova EBV-a je 75 %, a glavne su razlike u nukleotidnoj sekvenci Epstein-Barr nuklearnih antigena (engl. *Epstein-Barr nuclear antigen*, EBNA) i Epstein-Barr nekodirajućih RNA (engl. *Epstein-Barr encoded RNA*, EBER) (Begovac i sur., 2008). Kao i ostali herpesvirusi, EBV ima latentnu i produktivnu (i to litičku) fazu životnog ciklusa. Litička faza je odgovorna za virusnu produkciju i transmisiju nakon primarne infekcije. Smatra se da je virusom Epstein-Barr do dobi od četrdeset godina zaraženo otprilike 95% populacije (Luzuriaga, Sullivan, 2010). Asimptomatski nosioci virusa vrlo su česti (Sitki-Green i sur., 2003). EBV je glavni uzročnik infektivne mononukleoze (u 90% slučajeva), ali se povezuje i sa nekoliko malignih oboljenja poput Burkittovog limfoma, Hodgkinova limfoma i nazofaringealnog karcinoma kod imunosuprimiranih ili imunokompromitiranih osoba uključujući primatelje transplantiranih organa, HIV-pozitivne osobe i osobe starije životne dobi (Hatton i sur., 2014). Primarna infekcija u dječjoj dobi najčešće prolazi subklinički, a u adolescentnoj dobi u 50-75% slučajeva manifestira se kao infekcijska mononukleoza. Mnoge okolnosti mogu poremetiti osjetljivu ravnotežu EBV - domaćin i uzrokovati krajnje patogeni potencijal virusa. Primarna infekcija može se manifestirati kao infekcijska mononukleoza, ali može imati i smrtonosan ishod. U dječaka s X-vezanim limfoproliferativnim sindromom (Duncanov sindrom) nakon infekcije virusom Epstein-Barr dolazi do abnormalnog odgovora na infekciju koji vodi zatajenju funkcije jetre (uzrok su citotoksični limfociti T koji reagiraju s limfocitima B ili drugim tkivnim stanicama zaraženim s EBV-om), imunodeficijenciji, limfomu, smrtonosnoj limfoproliferativnoj bolesti i aplaziji koštane srži (Taylor i sur., 2015). Čovjek je jedini domaćin i prijenosnik infekcije. Za prijenos virusa potreban je neposredan kontakt s tjelesnom tekućinom (najčešće slinom) koja sadržava aktivno replicirajući virus. Virus se razmnožava u limfocitima B, stanicama višeslojnog pločastog epitela ždrijela, u cervikalnim

epitelnim stanicama, a dokazan je i u genitalnim sekretima muškaraca i žena što upućuje na mogućnost spolnog načina prijenosa (Johansenn i sur., 2005).

1.4. Struktura i genom EBV-a

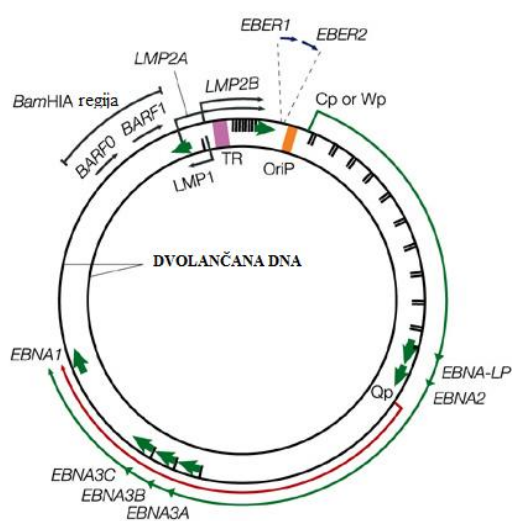
Virusi iz porodice *Herpesviridae* dijele niz temeljnih i strukturnih obilježja. Nukleokapsida je heksagonske strukture obavijena lipidnom ovojnicom na kojoj se nalaze glikoproteinski izdanci. Virioni EBV-a imaju promjer od 180 do 200 nm (Chiu i Rixon, 2002). Lipidnu ovojnicu virus je preuzeo od membrane stanice domaćina (Slika 1.). Izdanci glikoproteina u njoj (primjerice gp350) bitni su za vezanje virusa na ciljnu stanicu. Prostor između ovojnice i kapside je čvrsta ispuna, tzv. matriks. On sadržava proteine virusa i domaćina što uključuje i enzime koji su u interakciji sa stanicama domaćina i ometaju obrambeni odgovor stanica tijekom infekcije (Mettenleiter, 2002). Nukleokapsida ima 162 kapsomere raspoređene u promjeru od 100 nm unutar kojih se nalazi linearna dvolančana molekula DNA koja čini virusni genom (Morissete i Flamand, 2010).



Slika 1. Shematski prikaz viriona EBV-a (obrađeno s https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/The_Role_of_Epstein-Barr_Virus_in_Burkitt's_Lymphoma).

Genom EBV-a veličine je oko 172 tisuće parova baza i kodira stotinjak različitih proteina (Luzuriaga, Sullivan, 2009). Prema funkciji koju njihovi produkti imaju u virusnom ciklusu, razlikuju se geni zaduženi za latenciju i lizu. Prvo se počinju prepisivati geni zaduženi za latenciju i to EBNA-2, koji svojim djelovanjem na genom omogućuje prepisivanje svih ostalih EBNA proteina (EBNA-1, EBNA-3A/3, EBNA-3B/4, EBNA-3C/5 i EBNA-LP), a

nakon toga i „latentnih“ membranskih proteina, LMP1 i LMP2 (engl. *Latent membrane protein*, LMP), tako da je unutar 48-72 sata nakon infekcije dovršena kompletna ekspresija gena zaduženih za latenciju (Slika 2.) (Young i sur., 2007). Aktivacija i blastna transformacija limfocita B počinje 48 sati nakon infekcije i posljedica je djelovanja LMP-a. Unutar 72 sata, stanica prolazi kroz G1, S i G2-fazu staničnog ciklusa i ulazi u mitozu te se taj ciklus beskonačno ponavlja u zaraženim limfocitima B, pa se ta pojava označava kao imortalizacija limfocita B. Imortalizacija, odnosno transformacija limfocita B je proces koji nastaje kao posljedica djelovanja EBV genskih produkata zaduženih za latenciju, čija je funkcija održavanje virusnog genoma u stanici, te aktivacija ekspresije virusnih i staničnih gena nužnih za rast limfocita B i prevenciju stanične smrti. Samo u malom postotku imortaliziranih limfocita B (0-5 %) dolazi do litičke faze infekcije, kao posljedica ekspresije gena zaduženih za replikaciju (Begovac i sur., 2008). Geni zaduženi za replikaciju kodiraju proteine bitne za umnažanje i nastanak kompletnih virusnih čestica. Prema redoslijedu prepisivanja u virusnom ciklusu razlikuje se nekoliko skupina gena zaduženih za replikaciju: neposredno rani, rani i kasni (Knipe i Howley, 2007). Neposredno rani genski produkti bitni su za početak prepisivanja genoma, npr. ZEBRA protein (engl. *Z EBV replication activator*) koji dovodi do transaktivacije drugih ranih gena. Rani genski produkti predstavljaju proteinske komplekse koji se sastoje od tridesetak enzima bitnih u replikaciji virusne DNA, kao što su DNA-polimeraza i timidin kinaza. Produkti ranih gena omogućuju prepisivanje kasnih gena čiji su produkti strukturni proteini virusa poput VCP (engl. *viral capsid protein*) i gp350, koji predstavlja glavni glikoprotein virusne ovojnice (Begovac i sur., 2008).



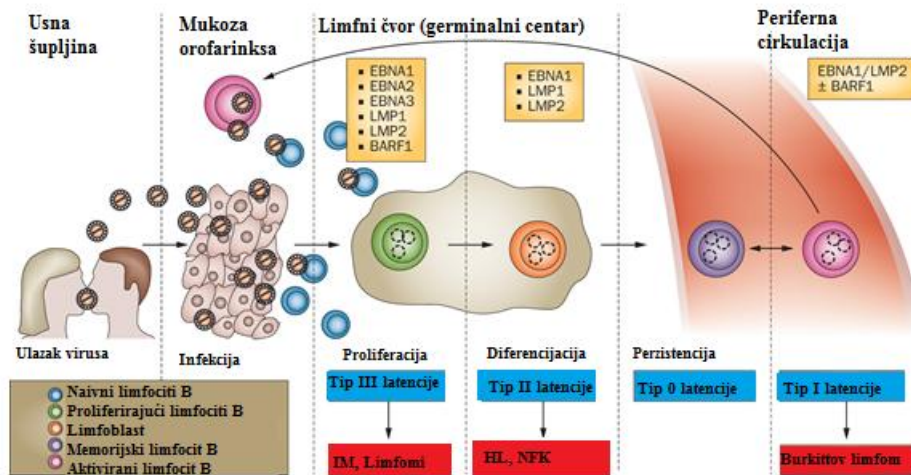
Slika 2. Genom EBV-a (obrađeno s

http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n10/fig_tab/nrc1452_F1.html).

1.5. Životni ciklus EBV-a

EBV se prenosi neposrednim kontaktom s tjelesnom tekućinom koja sadrži aktivno replicirajući virus, poglavito slinom, i zaražava epitelne stanice orofarinksa gdje se virus umnožava te inficira sve više naivnih limfocita B, što pokreće njihovu aktivaciju i transformaciju u limfoblaste (Hatton i sur., 2014) (Slika 3.). Nakon primarne infekcije, litička faza je odgovorna za virusnu produkciju i transmisiju. Receptor za EBV na limfocitima B je molekula CD21, ujedno i receptor za 3d-regiju C-komponente komplementa. Vezno mjesto za molekulu CD21 nalazi se na virusnom glikoproteinu gp350. Ulazak EBV-a u limfocit B odvija se interakcijom virusnog površinskog glikoproteina gp350/220 i staničnog receptora CD21 (Janz i sur., 2000). Nakon primarne reakcije gp350/220-CD21, gp42 se veže za površinske molekule HLA-II kao koreceptore, što je praćeno reguliranom fuzijom virusa i stanice od strane gH/gL kompleksa (Hutt-Fletcher i Lake, 2001). Virus ulazi u stanicu stapanjem ovojnice s ovojnicom ciljne stanice, nakon čega se nukleokapsida ubacuje u citoplazmu, a virusna DNA ostaje u jezgri stanice u zasebnom episomu i rijetko se ugrađuje u genom domaćina. Zbog sposobnosti recirkulacije između pojedinih limfnih organa, zaraženi limfociti B ubrzo se nađu posvuda u limfnom tkivu i ondje nastavljaju proliferirati (Begovac i sur., 2008). Virus se dugotrajno zadržava u domaćinu u latentnoj fazi. EBV uspostavlja tri različita tipa latentne faze infekcije. U aktiviranim limfoblastima dolazi do ekspresije čitavog seta proteina zaduženih za latenciju (LMP1, LMP-2A, -2B, EBNA-1, -2, -3, -4, -5, -6) te se uspostavlja tip III latencije. Zaraženi limfoblasti jako su imunogeni te zbog toga vrlo brzo bivaju uništeni citotoksičnim CD8⁺ limfocitima T koji na taj način eliminiraju akutnu infekciju (Myung-Soo i Kieff, 2015). Virus preživljava u limfocitima B zahvaljujući suprimiranju imunogenih proteina limfocita u dvije faze. Zaraženi limfociti B se transportiraju do limfoidnih folikula gdje proliferiraju ekspimirajući samo 3 virusna proteina: EBNA-1, LMP1 i LMP2 (tip II latencije). U idućoj fazi, limfociti napuštaju limfni čvor diferencirani u memorijske limfocite B bez ekspimiranja virusnih proteina (tip latencije 0) zbog čega su postali nevidljivi za imunosno prepoznavanje. Ako cirkulirajući memorijski limfociti B ponovno aktiviraju transkripciju, stanice se dijele i ekspimiraju protein EBNA-1 (tip I latencije), što osigurava da se sa genom limfocita podijeli i virusni genom (Raab-Traub, 2002). Zaraženi memorijski limfociti B se cirkulirajući mogu vratiti u orofarinksa gdje prenose virus na epitelne stanice. Tada dolazi do diferencijacije u plazma stanice i pokretanja litičke faze infekcije sa kompletnom virusnom replikacijom i izlučivanjem virusa putem sline. Na taj način, virus se može prenijeti na novog domaćina (Bollard i sur., 2012). Navedeni tipovi

latencije zamjećeni su i kod specifičnih vrsta limfoma: tip I latencije kod Burkittova limfoma, tip II u Hodgkinovoj bolesti i u nazofaringealnom karcinomu te tip III koji je karakterističan za infektivnu mononukleozu i limfoblastične limfome pronađene kod transplantiranih pacijenata i HIV-pozitivnih pacijenata (Hatton i sur., 2014).



Slika 3. Životni ciklus EBV-a (obrađeno s http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v9/n9/fig_tab/nrclinonc.2012.111_F1.html).

1.6. Imunopatogeneza infekcije EBV-om

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća, Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *The International Agency for Research on Cancer*, IARC) objavila je da je više od 90% odraslih ljudi u svijetu zaraženo virusom Epstein-Barr, temeljeno na podacima o detekciji specifičnih protutijela za EBV: protutijela IgM na EBV-kapsidni antigen (engl. *viral capsid antigen*, VCA) (de Thé i sur., 1975). Dob u kojoj se javlja primarna infekcija EBV-om razlikuje se te ovisi o socioekonomskom standardu zemlje. U zemljama s nižim socioekonomskim standardom, primarna infekcija događa se u ranoj dobi. Za razliku od nerazvijenih i zemalja u razvoju, u razvijenim zemljama češća je infekcija kod starije djece, adolescenata i mladih odraslih ljudi. Primarna infekcija kod male djece najčešće prolazi asimptomatski, dok se kod adolescenata i mlađih odraslih ljudi manifestira kao infekcijska mononukleozu (u 25-75% slučajeva zaraze EBV-om) (Hsu i Glaser, 2000). Infekcijska mononukleozu je samoograničavajuća limfoproliferativna bolest čiji inkubacijski period traje između 4 do 6

tjedana nakon infekcije. Klinička slika oboljelih se razlikuje, a bolest se najčešće manifestira grloboljom, temperaturom, jakim osjećajem umora, povećanim limfnim čvorovima i splenomegalijom. Na proliferaciju zaraženih limfocita B ubrzo se javlja odgovor stanica NK, stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) te specifični T-stanični citotoksični odgovor, što dovodi do još snažnije poliklonske limfoproliferacije. Nekoliko dana od početka infekcije u imunokompetentnih osoba dolazi do jake specifične aktivacije T-limfatičkog sustava, pa glavnu ulogu u svladavanju infekcije imaju izvršni citotoksični limfociti (CTL). Oni prepoznaju epitope u sprezi s molekulama MHC-I, a najčešće su usmjereni protiv proteina LMP-1. Simptomi koji se počinju javljati posljedica su litičke infekcije i umnažanja litičkih stanica (Vince, Dušek, 2006). U primarnoj infekciji počinju se stvarati protutijela IgM i IgG na virusni kapsidni antigen (VCA). Kod pacijenata s akutnom primarnom EBV infekcijom ili reaktivacijom EBV-a mogu se detektirati IgG protutijela za raspršenu komponentu ranih antigena (engl. *early antigen (diffuse)*, EA(D)). Protutijela IgG za EBNA pojavljuju se u cirkulaciji nekoliko tjedana ili mjeseci nakon početka bolesti i perzistiraju u većine zaraženih doživotno. Akutnu EBV infekciju karakterizira samoograničavajuća proliferacija pomoćničkih CD4⁺ i citotoksičnih CD8⁺ limfocita T. Citotoksični CD8⁺ limfociti T uništavaju EBV-om zaražene limfocite B i na taj način eliminiraju akutnu infekciju nakon čega slijedi doživotna latentna infekcija (Đaković-Rode i sur., 2005). Kod imunokompetentnih osoba unutar dva do tri tjedna dolazi do eliminacije većine zaraženih limfocita B te do smirivanja limfoproliferacije i postupnog nestanka simptoma. Stanovit broj limfocita B i epitelnih stanica ždrijela ostaje doživotno zaražen virusom u latentnom obliku (Vince i Dušek, 2006).

1.7. Dijagnostika i liječenje infekcije EBV-om

Za potvrdu dijagnoze infekcijske mononukleoze koriste se različiti serološki testovi. Paul i Bunnell su 1932. godine razvili test heterofilnih protutijela (Paul-Bunnellov test) koji se još uvijek koristi za postavljanje dijagnoze infekcijske mononukleoze (pozitivan kod 80-85 % oboljelih). Test ima nedostatke jer su moguće lažno negativne reakcije kod djece ispod 4 godine (Horwitz i sur., 1981) i lažno pozitivne kod različitih malignih i autoimunih oboljenja (Fischer i Bhalara, 2004). Danas se etiološka dijagnoza uglavnom postavlja dokazom protutijela na određene antigene virusa, najčešće uz pomoć specifičnih imunoenzimskih testova (engl. *The enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). ELISA je imunokemijski

test u kojemu se antigen ili protutijela, vezani za netopljive čestice ili plastičnu podlogu, otkrivaju uz pomoć enzima koji oboji bezbojni supstrat. Enzim se nalazi na obilježenim antiimunoglobulinskim protutijelima (Andreis i sur., 2010). Tijekom infekcije EBV-om zbog poliklonske stimulacije limfocita B ubrzo dolazi do sinteze velikih količina protutijela na određene virusne epitope i zbog toga se može odrediti faza infekcije praćenjem pojave pojedinih protutijela (Vince i Dušek, 2006) (Tablica 2.).

Protutijela IgM i IgG na virusni kapsidni antigen (IgM anti-VCA i IgG anti-VCA) javljaju se tijekom akutne faze infekcije. IgM anti-VCA su prisutna u 75 % pacijenata već u prvih desetak dana primarne infekcije, a potpuno nestaju kroz dva-tri mjeseca. Za razliku od IgM anti-VCA, IgG anti-VCA perzistiraju doživotno u nižem titru nego u akutnoj fazi infekcije (Balfour i sur., 2013). Protutijela IgG na citoplazmatske rane antigene (IgG anti-EA) nisu dobar dijagnostički pokazatelj primarne infekcije jer se javljaju samo kod 60-80 % oboljelih u akutnoj fazi infekcije te se ta protutijela mogu detektirati i kod 20 % zdravih osoba (Hess, 2004). Protutijela na EBNA (IgG anti-EBNA) javljaju se u vremenu od 4 do 8 tjedana od početka bolesti i održavaju se doživotno, pa su kod prvog određivanja najčešće negativna (De Paschale i Clerici, 2012).

Tablica 2. Pojavljivanje specifičnih protutijela u različitim fazama EBV infekcije (Balfour i sur., 2015).

Faze infekcije	Vrijeme od pojave simptoma bolesti	Protutijela			
		IgM anti-VCA	IgG anti-VCA	IgG anti-EA	IgG anti-EBNA
Akutna infekcija	0-3 tjedna	+	+	+/-	-
Subakutna infekcija	4 tjedna – 3 mjeseca	+	+	+/-	+/-
Prošla infekcija	4 – 6 mjeseci	-	+	-	+
Reaktivacija	...	+/-	+	+	+

Analiza distribucije različitih limfocitnih subpopulacija može se koristiti kao pomoćna metoda u dijagnosticiranju infekcijske mononukleoze. Imunofenotipizacijski profil limfocita periferne krvi karakterističan je kod bolesnika s infekcijskom mononukleozom. Zabilježeno je povećanje postotka limfocita T i smanjenje postotka limfocita B. Postotci CD8⁺ limfocita T u krvi bolesnika su povećani, dok je postotak CD4⁺ limfocita T i omjer CD4⁺/CD8⁺ smanjen, uz

održan apsolutni broj CD4⁺ limfocita T (Rakušić i sur., 2000). Povećana ekspresija biljega stanične aktivacije (primjerice CD38 i HLA-DR) na limfocitima T također je uobičajena u bolesnika s infektivnom mononukleozom (Židovec Lepej i sur., 2003).

Učinkovitog antivirusnog lijeka još nema. Aciklovir i famciklovir smanjuju replikaciju virusa, ali ne utječu na pojavu simptoma, trajanje bolesti i pojavu komplikacija. Kratkotrajna primjena kortikosteroida indicirana je u slučajevima akutne opstrukcije gornjih dišnih putova, teže autoimune hemolitičke anemije i trombocitopenije. Ostala simptomatska terapija uključuje mirovanje dok postoji značajno povećanje slezene, primjenu sredstava za snižavanje temperature, analgetika i nadoknadu tekućine. Antibiotici ne utječu na tijek infektivne mononukleoze, osim u slučajevima bakterijske superinfekcije u ždrijelu (Begovac i sur., 2008).

1.8. Protočna citometrija

Protočna citometrija je metoda kojom se simultano mjere fizikalna i kemijska svojstva stanica. Uzorak koji se analizira na protočnom citometru mora biti suspenzija pojedinačnih stanica. Protočni citometar se sastoji od tri međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog (Shapiro, 2003). Protočni dio omogućuje da se uzorak pomoću izotonične tekućine prenese do laserske zrake. Optički dio čine laseri i optički filteri koji usmjeravaju reflektirane zrake svjetlosti na detektore. Prolaskom stanice kroz lasersku zraku dolazi do rasipanja svjetlosti, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica – veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom 0,5-10°, FS prema engl. *forward scatter*- usmjereno rasipanje svjetlosti) i granuliranosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom, SS prema engl. *side scatter* - bočno rasipanje svjetlosti). Ti se svjetlosni signali uz pomoć elektroničkog dijela pretvaraju u elektroničke signale i obrađuju uz pomoć posebnog programa. Kako bi mogli razlikovati pojedine stanične populacije potrebno ih je obilježiti specifičnim protutijelima koja na sebi imaju vezan fluorokrom. To je molekula koja absorbira svjetlost određene, njoj karakteristične, valne duljine i pri tome elektroni u fluorokromu prelaze u pobuđeno stanje. Prilikom njihovog povratka u osnovno stanje elektroni emitiraju svjetlost manje energije, tj. veće valne duljine, nego što je bila pobuđujuća svjetlost. Svaki fluorokrom ima specifičan absorpcijski i emisijski spektar što omogućuje njihovu analizu, a time i prepoznavanje različitih staničnih populacija u uzorku. Najčešći fluorokromi koji se koriste su fikoeritrin (engl. *phycoerythrin*, PE) i fluorescein izotiocijanat (engl. *fluorescein-isothiocyanate*, FITC).

Protočna citometrija je standardna metoda laboratorijske medicine koja se najčešće koristi u dijagnostici brojnih zaraznih i malignih bolesti, ali ima i značajnu ulogu u temeljnim znanstvenim istraživanjima. Imunološka fenotipizacija multiparametarskom analizom na protočnom citometru je osnovna metoda za određivanje broja i karakterizaciju imunoloških staničnih populacija u zdravlju i bolesti. Standardizirani postupci su neophodni kako bi se omogućila usporedba dobivenih rezultata između pojedinaca u kontekstu populacije ili na temelju kliničkih studija (Hasan i sur., 2015).

Za tu svrhu se koriste monoklonska protutijela koja se vežu za specifične stanične molekule (CD-biljege) izražene na membrani ili u citoplazmi stanica. Dio molekula eksprimiran je konstitutivno na staničnoj membrani dok se dio molekula pojavljuje isključivo tijekom stanične aktivacije. Panel za fenotipizaciju limfocita uključuje biljege leukocita (CD45), limfocita T (CD3, CD4 i CD8), limfocita B (CD19) i stanica NK (CD16, CD56). Za

tumačenje i prikazivanje rezultata limfocitnih subpopulacija periferne krvi koriste se referentne vrijednosti. Udio i apsolutni broj limfocitnih subpopulacija u krvi ovisi o dobi i spolu, pa za djecu i starije osobe uvijek se koriste primjereni referentni rasponi (Batinić i sur., 2006). Zbog sazrijevanja i napredovanja imunološkog sustava u prvim godinama života, udio i apsolutni broj limfocitnih subpopulacija variraju tijekom djetinjstva. Stoga su Comans-Bitter i suradnici 1997. godine proveli istraživanje kako bi dobili referentne vrijednosti za relativan i apsolutan broj svih relevantnih subpopulacija limfocita u krvi u djetinjstvu. Koristili su 378 uzoraka pune krvi koje su podijelili u osam dobnih skupina: od jednog tjedna do dva mjeseca, od dva do pet mjeseci, od pet do devet mjeseci, od devet do 15 mjeseci, od 15 do 24 mjeseca, od dvije do pet godina, pet do deset godina i od deset do 16 godina. Pokazali su da promjene u apsolutnom broju limfocitnih subpopulacija nisu uvijek u skladu sa relativnim brojem te da se dijagnostikovanje hematoloških i imunoloških poremećaja treba temeljiti na apsolutnom prije nego na relativnom broju limfocitnih subpopulacija (Comans-Bitter i sur., 1997).

Određivanje referentnih vrijednosti važno je kako bi se dobili podaci koji su što bliže stvarnim vrijednostima u zdravih osoba s ciljem da se ispitanik proglasi zdravim ili da se postavi dijagnoza određene bolesti. Hasan i suradnici su 2015. godine optimizirali panel za imunofenotipizaciju uzoraka pune krvi ističući standardizirane i automatizirane postupke koje su pritom koristili. Dizajnirali su četiri panela za određivanje fenotipa i broja glavnih imunoloških staničnih populacija (polimorfonuklearnih leukocita, limfocita T, limfocita B, NK stanica, monocita i dendritičkih stanica). Za optimizaciju istraživanja i razvoj panela prikupili su uzorke pune krvi od 600 zdravih donora volontera na Institutu Pasteur u Parizu. Tim istraživanjem uspostavili su temelj za definiranje referentnih vrijednosti u zdravih donora koje se mogu koristiti u kontekstu istraživanja populacije ili kliničkih studija. Također, Melzer i suradnici su 2015. godine odredili imunofenotipizacijski profil 608 zdravih osoba s područja Leipziga (Njemačka) u dobi od 40 do 79 godina metodom protočne citometrije kako bi dobili referentne podatke za različite subpopulacije leukocita uključujući granulocite, monocite i limfocite. Istraživali su i utjecaj spola i dobi na leukocitne subpopulacije. Dobiveni referentni intervali za subpopulacije leukocita iz periferne krvi korisni su za razumijevanje stadija bolesti i učinaka terapije (Melzer i sur., 2015).

Neke od primjena protočne citometrije u dijagnostičke svrhe su analiza limfocita periferne krvi u cilju procjene imunološkog statusa, imunofenotipizacija leukemija i limfoma te praćenje ostatnih malignih stanica (minimalne rezidualne bolesti), mjerenje broja CD34+ krvotvornih matičnih stanica u perifernoj krvi i leukocitnom koncentratu za potrebe transplantacije krvotvornih matičnih stanica, dijagnostika paroksizmalne noćne

hemoglobinurije (PNH), mjerenje sadržaja stanične DNA u cilju otkrivanja aneuploidija (najčešće u leukemijama) i proliferacijske aktivnosti stanica (za funkcijske testove limfocita ili procjenu proliferacije tumorskih stanica) (Batinić i sur., 2006). Praćenje limfocitnih subpopulacija ima velik značaj u dijagnostici specifičnih imunodeficijencija, primjerice parcijalnog Di Georgeovog sindroma (Chinen i sur., 2003).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je protočnom citometrijom periferne krvi odrediti imunofenotipizacijski profil uzoraka ispitanika s kliničkom dijagnozom infektivne mononukleoze. Ispitanicima uključenima u ovo istraživanje određeni su postotci pojedinih limfocitnih subpopulacija i uspoređeni s referentnim vrijednostima za zdrave osobe.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Odjelu za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, od početka siječnja do kraja lipnja 2015. U istraživanje je uključena 31 odrasla osoba (osobe starije od 16 godina) s kliničkom dijagnozom infektivne mononukleoze uzrokovane EBV-om, uz dokaz serološke i molekularne dijagnostike (mjerljiva EBV DNA u krvi ispitanika). Uzorci zaraženih osoba prikupljeni su u okviru rutinskih dijagnostičkih postupaka.

3.2. Biološki uzorci

Za potrebe određivanja postotka pojedinih limfocitnih subpopulacija metodom protočne citometrije uzimana je periferna krv venepunkcijom u sterilnu Vacutainer epruvetu s antikoagulansom K₃EDTA (etilidiamintetraoctena kiselina) od 7 ml. Uzorke za protočnu citometriju sam pohranila na sobnoj temperaturi do analize.

3.3. Reagensi i otopine za protočnu citometriju

- Reagens koji sadrži kombinaciju monoklonskih protutijela specifičnih za molekule CD45, CD4, CD8 i CD3. CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5 Monoclonal Antibody Reagents for use with tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).
- Reagens koji sadrži kombinaciju monoklonskih protutijela specifičnih za molekule CD45, CD56, CD19 i CD3. CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 Monoclonal Antibody Reagents for use with tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).
- Monoklonsko protutijelo specifično za molekulu HLA-DR. HLA-DR-PC-7 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).
- Monoklonsko protutijelo specifično za molekulu CD38. CD38-PC-7 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).
- Reagens koji se sastoji od tri otopine za pripremu stanica za analizu na protočnom citometru. Immunoprep A sadrži mravlju kiselinu (1,2 mL/L) i stabilizator, Immunoprep B otopinu soli Na₂CO₃ (6,0 g/L), NaCl (14,5 g/L), Na₂SO₄ i stabilizator, te Immunoprep C paraformaldehid (10,0 g/L) i pufer. ImmunoPrep Reagent System Whole Blood lysing reagent (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

- Otopina fluorosfera poznate koncentracije na koje je vezana boja s emisijskim spektrom od 525 nm do 700 nm nakon ekscitacije na 488 nm, te omogućuje direktno određivanje apsolutnog broja limfocitnih subpopulacija na protočnom citometru. Flow-Count™ Fluorospheres absolute count determination on CXP Flow Cytometry System (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).
- Reagens koji sadrži polistirenske fluorescentne mikrosfere promjera 10 µm u koncentraciji od 1×10^6 fluorosfera/mL, te emisijskim spektrom valnih duljina od 525 nm do 700 nm nakon ekscitacije na 488 nm. Služi za provjeru optičkog i protočnog dijela citometra. Flow-Check™ Fluorospheres, Flow Cytometer Alignment Verification (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).
- Izotonična otopina koja se u citometru miješa s uzorkom. IsoFlow™ Sheath Fluid Azide free balanced electrolyte solution (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).
- Otopina proteolitičkih enzima koja služi za čišćenje citometra. AC-T Rinse™ Shutdown Diluent (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

3.4. Oprema, računalni programi i potrošni materijal

- aparat za pipetiranje uzoraka za protočnu citometriju Coulter PrepPlus 2 (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD)
- aparat za pripremu uzoraka za protočnu citometriju Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD)
- protočni citometar CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD) s pripadajućim CXP softverom povezan s računalom Pentium (IBM, Armonk, NY, SAD) i laserskim štampačem Business inkjet 2300 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, SAD)
- Epruvete za uzimanje krvi K₃EDTA VACUTAINER (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ SAD)
- Polistirenske epruvete 12x75 mm (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, SAD)

3.5. Metode

3.5.1. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi

Uzorke periferne krvi za analizu metodom protočne citometrije pripremila sam pomoću aparata PrepPlus 2 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) koji je programiran da u silikonizirane polistirenske epruvete (12x75 mm) dodaje po 10 µL odabrane kombinacije monoklonskih protutijela obilježenih fluorokromima, te 100 µL periferne krvi. Za svaki uzorak potrebne su dvije epruvete. U jednoj je kombinacija slijedećih monoklonskih

protutijela (peterostruko bojanje): CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD3-PC-5 i CD38-PC7, a u drugoj: CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 i HLA-DR PC7. Tako pripremljene uzorke inkubirala sam 10 minuta u mraku u aparatu TQ-Prep (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) koji po isteku vremena automatski započinje lizu eritrocita i fiksiranje limfocitne membrane dodavanjem otopina ImmunoPrep A, B i C. ImmunoPrep A je otopina mravlje kiseline koja uzrokuje lizu eritrocita bez narušavanja integriteta membrana limfocita. ImmunoPrep B zaustavlja djelovanje reagensa ImmunoPrep A i djeluje kao stabilizator, dok ImmunoPrep C fiksira membrane limfocita. Prije analize uzoraka citometar sam standardizirala otopinom Flow-CheckTM koja sadrži polistirenske fluorescentne mikrosfere promjera 10 µm u koncentraciji od 1×10^6 fluorosfera/mL, te emisijskim spektrom valnih duljina od 525 nm do 700 nm nakon ekscitacije na 488 nm koja služi za provjeru optičkog i protočnog dijela citometra. U pripremljeni uzorak pomoću aparata PrepPlus 2, neposredno prije analize na protočnom citometru, dodala sam 100 µL kvantifikacijskog reagensa Flow CountTM fluorosfera (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) kako bi mogla odrediti apsolutni broj CD4+ limfocita T. Pripremljene uzorke sam analizirala na protočnom citometru CYTOMIX FC 500 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD), a dobivene podatke obradila pomoću CXP softvera samog aparata. Kako bih odvojila limfocite od ostalih stanica krvi koristila sam biljeg CD45 koji se još naziva i leukocitni zajednički antigen jer se nalazi na membrani svih leukocita i parametar bočnog raspršenja svjetlosti (engl. side scatter, SS) na jednom histogramskom prikazu, te parametre prednjeg (engl. forward scatter, FS) i bočnog raspršenja svjetlosti na drugom histogramu. Ovom metodom odredila sam zastupljenost pojedinih limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi i to postotke limfocita T, limfocita B, CD4+ limfocita T, CD8+ limfocita T, NK stanica, aktiviranih limfocita T (pomoću biljega HLA-DR), aktiviranih CD8+CD38+ limfocita T, te apsolutni broj CD4+ limfocita T. Za direktno određivanje apsolutnog broja CD4+ limfocita T na protočnom citometru koristila sam suspenziju fluorosfera poznate koncentracije na koje je vezana boja s emisijskim spektrom od 525 nm do 700 nm nakon ekscitacije na 488 nm (Flow-CountTM Fluorospheres). Fluorosfere imaju jedinstvenu veličinu i intenzitet fluorescencije, a poznata koncentracija omogućuje određivanje apsolutnog broja ispitivanih stanica.

Referentne vrijednosti za zdrave odrasle osobe, za sve limfocitne subpopulacije osim CD8+CD38+ limfocite, koje sam koristila za usporedbu vrijednosti postotaka i apsolutnog broja limfocitnih subpopulacija ispitanika uključenih u ovo istraživanje preuzela sam iz Beckman-Coulter analize. Bisset i suradnici su 2004. godine odredili referentnu vrijednost za

aktivirane CD8+CD38+ limfocite T (Tablica 3.). Prema tim vrijednostima sam odredila statističku značajnost dobivenih rezultata.

Tablica 3. Referentne vrijednosti za imunofenotipizaciju limfocitnih subpopulacija (studija Beckman-Coulter, 2015; Bisset i sur., 2004).

Subpopulacije limfocita	Referentne vrijednosti za zdrave odrasle osobe (%)
Limfociti T (CD3+)	60,0-85,0
Limfociti B (CD19+)	5,0-20,0
Pomoćnički limfociti T (CD3+/CD4+)	35,0-60,0
Apsolutni broj CD4+ limfocita T (stanica/μL krvi)	500-1500/ μ L krvi
Citotoksični limfociti T (CD3+/CD8+)	10,0-30,0
Stanice NK (CD3-/CD56+)	0,0-15,0
CD8+/CD38+	0,9-7,0
Aktivirani limfociti T (CD3+/HLA-DR+)	0,0-10,0

3.6. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišteni su programi Microsoft Excel (Microsoft) i Statistica (Microsoft). Korišten je Fisherov egzaktni test za ispitivanje razine značajnosti između dvije skupine nezavisnih kategoričkih podataka. Razina statističke značajnosti definirana je s vrijednosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

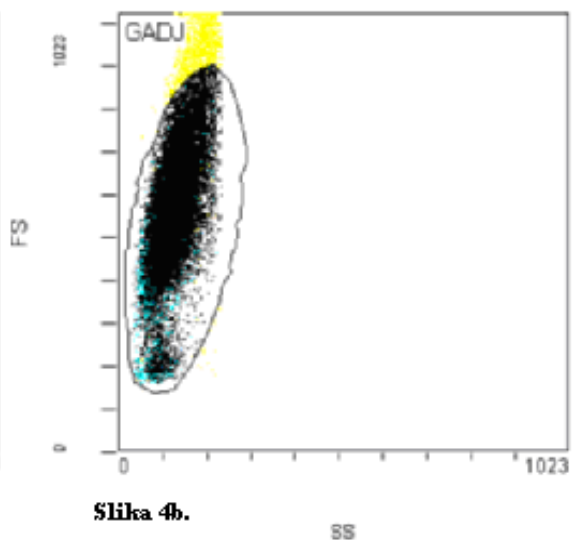
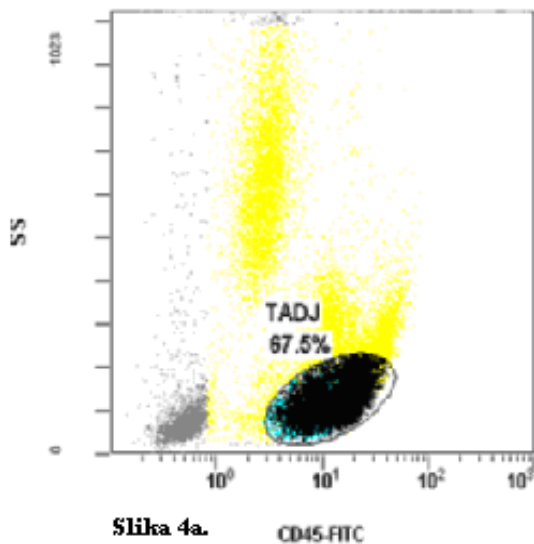
4.1. Podaci o ispitanicima

Istraživanje je obuhvatilo 31 osobu s kliničkom dijagnozom infekcijske mononukleoze uzrokovane virusom Epstein-Barr. Raspon dobi ispitanika bio je od 17 do 67 godina. Medijan dobi ispitanika iznosi 32 godine. U ukupnom uzorku bilo je 20 (64,5%) muških ispitanika.

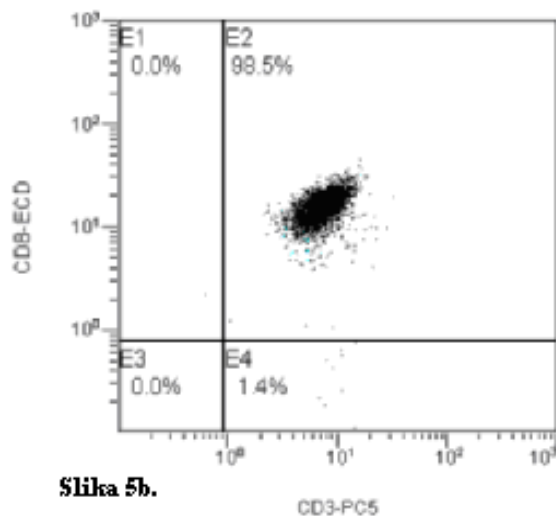
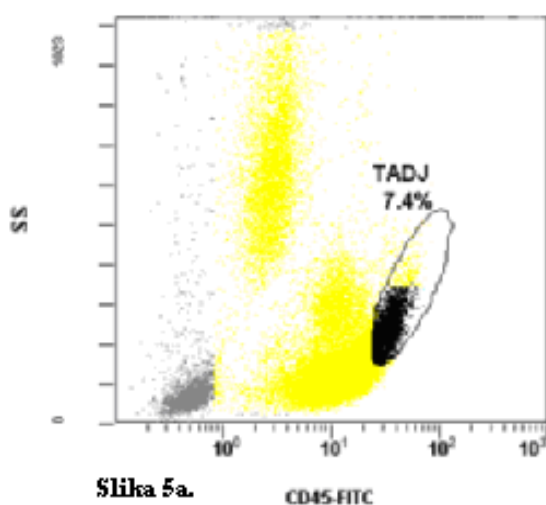
4.2. Rezultati imunofenotipizacijskog profila limfocita periferne krvi ispitanika

4.2.1. Histogrami

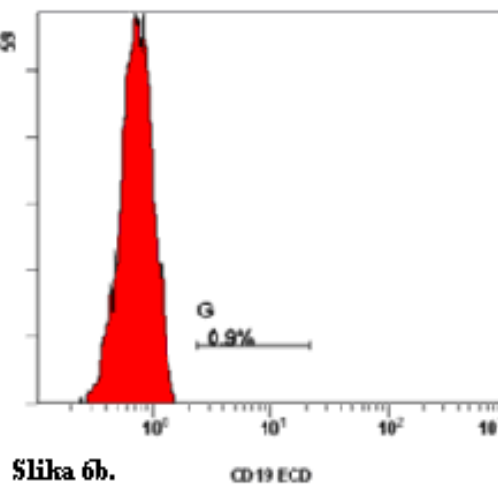
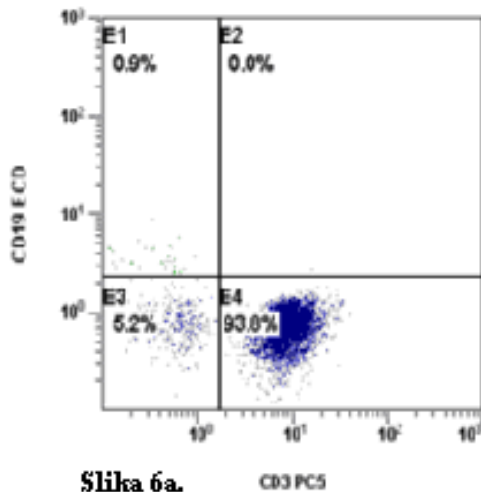
Podaci dobiveni analizom uzoraka na protočnom citometru analizirani su CXP softverom te prikazani pomoću dvoparametarskih histograma. Na prvom dvoparametarskom histogramu, koji prikazuje odnos različitih staničnih populacija u krvi (neutrofili, monociti, limfociti) prema zrnatosti (SS, engl. side scatter) i panleukocitnom biljegu CD45, postavila sam ogradu oko populacije limfocita (Slika 4a.). Zatim sam postavila ogradu oko limfocitne populacije na novom dvoparametarskom histogramu koji prikazuje odnos stanica prema veličini (FS) i zrnatosti (SS) (Slika 4b.). Kada sam tu istu limfocitnu ogradu na prvom histogramu (SS-CD45) pomaknula u smjeru limfocita koji sadrže više granula (Slika 5a.), na dvoparametarskom histogramu koji prikazuje odnos ekspresije biljega CD3 i CD8 jasno se vidi da su to u najvećem postotku reaktivni CD8⁺ limfociti T (Slika 5b.). Na ostalim histogramima analizirala sam ekspresiju specifičnih biljega za pojedine stanice (Slika 6-9).



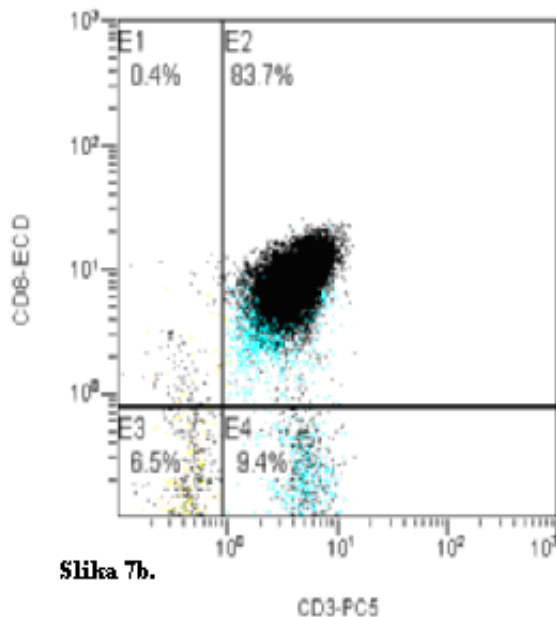
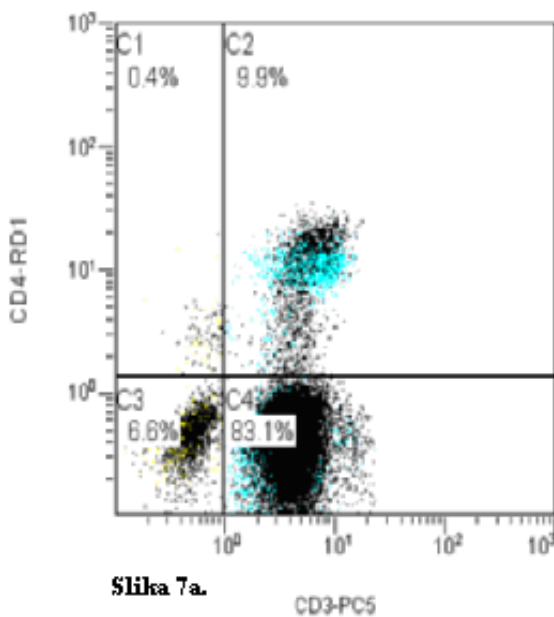
Slika 4. Detekcija limfocita protočnom citometrijom. Postavljena je ograda oko limfocitne populacije. Slika 4a. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos stanica prema zrnatosti (SS) i panleukocitnom biljegu CD45 kod ispitanika zaraženog EBV-om. Slika 4b. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos stanica prema veličini (FS) i zrnatosti (SS) kod ispitanika zaraženog EBV-om.



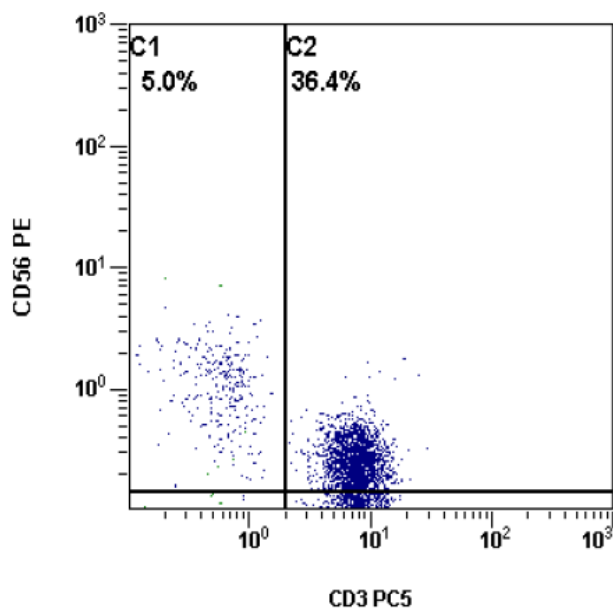
Slika 5. Detekcija većih i zrnatijih limfocita protočnom citometrijom pomicanjem ograde oko limfocitne populacije. Slika 5a. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos stanica prema zrnatosti (SS) i panleukocitnom biljegu CD45 kod ispitanika zaraženog EBV-om. Slika 5b. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos ekspresije biljega CD3 i CD8. Pomicanjem limfocitne ograde prema limfocitima sa više granula vidljivi su limfociti koji ekspimiraju biljege CD3+CD8+. Citotoksični limfociti T su CD3+CD8+ stanice koje se nalaze u E2 kvadrantu.



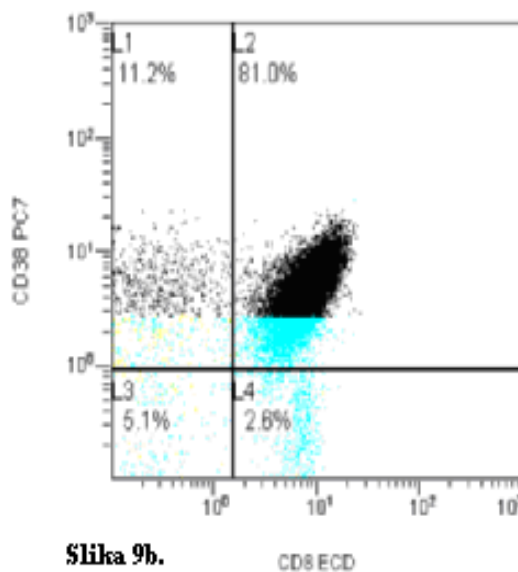
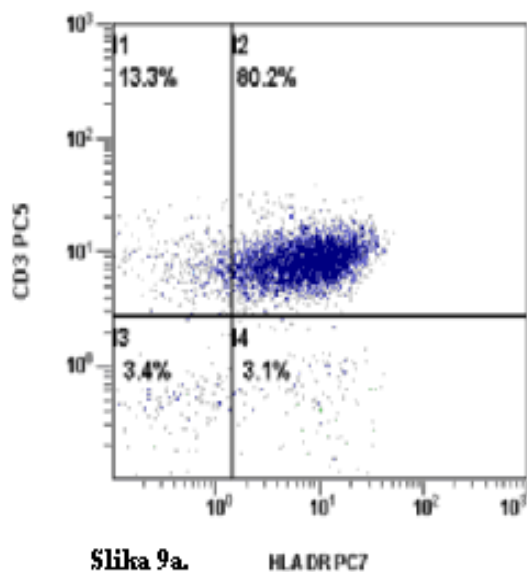
Slika 6. Primjer histograma u ispitanika zaraženog EBV-om za detekciju limfocita B protočnom citometrijom. Slika 6a. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos ekspresije biljega CD19 i CD3. Limfociti B su CD3-CD19+ stanice koje se nalaze u E1 kvadrantu. Slika 6b. Histogram koji pokazuje ekspresiju molekule CD19 koja se nalazi na limfocitima B.



Slika 7. Primjer histograma protočne citometrije u ispitanika zaraženog EBV-om za detekciju limfocita T. Slika 7a. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos ekspresije biljega CD3 i CD4. Pomoćnički limfociti T su CD3+CD4+ stanice koje se nalaze u E2 kvadrantu. Slika 7b. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos ekspresije biljega CD3 i CD8. Citotoksični limfociti T su CD3+CD8+ stanice koje se nalaze u E2 kvadrantu.



Slika 8. Primjer histograma protočne citometrije u ispitanika zaraženog EBV-om za detekciju NK stanica (CD56). Dvoparametarski histogram prikazuje odnos ekspresije biljega CD3 i CD56. Stanice NK su CD3-CD56+ stanice koje se nalaze u C1 kvadrantu.



Slika 9. Primjer histograma protočne citometrije u ispitanika zaraženog EBV-om za detekciju aktiviranih limfocita T. Slika 9a. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos ekspresije biljega CD3 i aktiviranih limfocita T (pomoću biljega HLA-DR). Aktivirani limfociti T su CD3+HLA-DR+ stanice koje se nalaze u I2 kvadrantu. Slika 9b. Dvoparametarski histogram prikazuje odnos ekspresije biljega CD3 i aktiviranih CD8+CD38+ limfocita T. Aktivirani limfociti T su CD8+CD38+ stanice koje se nalaze u L2 kvadrantu.

4.2.2. Imunofenotipizacijski profil limfocita periferne krvi ispitanika - statistička analiza

Metodom protočne citometrije odredila sam imunofenotipizacijski profil limfocita periferne krvi ispitanika. Zastupljenost pojedinih limfocitnih subpopulacija: limfocita T, limfocita B, CD4⁺ limfocita T, CD8⁺ limfocita T, NK stanica, aktiviranih limfocita T (pomoću biljega HLA-DR), aktiviranih CD8⁺CD38⁺ limfocita T, te apsolutnog broj CD4⁺ limfocita T (medijan, minimum-maksimum) u perifernoj krvi u odraslih ispitanika zaraženih EBV-om u usporedbi sa referentnim vrijednostima za zdrave odrasle osobe prikazani su u tablici 4.

Svi ispitanici s infektivnom mononukleozom uzrokovanom EBV-om pokazuju ujednačen uzorak zastupljenosti pojedinih limfocitnih subpopulacija u usporedbi sa referentnim vrijednostima. Postoci citotoksičnih CD8⁺ limfocita T u svih ispitanika zaraženih EBV-om pokazuju višu vrijednost od gornje granice referentnih vrijednosti. Ekspresija aktivacijske molekule HLA-DR na limfocitima T u svih ispitanika veća je u odnosu na gornju granicu referentnih vrijednosti. Postotak aktiviranih CD8⁺CD38⁺ limfocita T u svih ispitanika pokazuje veću vrijednost od gornje granice referentnih vrijednosti. Postoci ukupnih limfocita T u ispitanika sa EBV-infekcijom statistički su značajno veći u usporedbi sa referentnim vrijednostima ($p < 0,0001$). Suprotno tome, EBV infekcija kod ispitanika uzrokovala je statistički značajno smanjene postotke limfocita B u usporedbi sa referentnim vrijednostima ($p < 0,0001$). Također, statistički značajno su smanjeni postoci pomoćničkih CD4⁺ limfocita T ($p < 0,0001$). Apsolutni broj pomoćničkih CD4⁺ limfocita T ne razlikuje se statistički značajno od referentnih vrijednosti. Postoci stanica NK periferne krvi u ispitanika uključenih u ovo istraživanje ne pokazuju statistički značajna odstupanja od referentnih vrijednosti.

Tablica 4. Zastupljenost pojedinih limfocitnih subpopulacija (medijan, minimum-maksimum) u perifernoj krvi kod odraslih ispitanika zaraženih EBV-om u usporedbi sa referentnim vrijednostima za zdrave odrasle osobe.

Subpopulacije limfocita (%) medijan (minimum-maksimum)	Infekcijska mononukleoza uzrokovana EBV-om	Referentne vrijednosti za zdrave odrasle osobe (minimum-maksimum) (%)	p-vrijednost
Limfociti T (CD3+)	86,1* (77,2-95,0)	60,0-85,0	<0,0001
Limfociti B (CD19+)	2,22* (0,4-7,6)	5,0-20,0	<0,0001
Pomoćnički limfociti T (CD3+/CD4+)	16,5* (8,9-39,1)	35,0-60,0	<0,0001
Apsolutni broj CD4+ limfocita T (stanica/μL krvi)	954/μL krvi (409-1761/μL krvi)	500-1500/μL krvi	0,42
Citotoksični limfociti T (CD3+/CD8+)	65,3** (43,0-83,8)	10,0-30,0	**
Stanice NK (CD3-/CD56+)	11,8 (3,0-17,8)	0,0-15,0	0,25
CD8+/CD38+	58,7** (18,7-81,3)	0,9-7,0	**
Aktivirani limfociti T (CD3+/HLA-DR+)	59,3** (12,5-82,4)	0,0-10,0	**
* Statistički značajna razlika u usporedbi sa referentnim vrijednostima (Fisherov egzaktni test, p<0,05)			
**U svih ispitanika postotak je veći od gornje granice referentnih vrijednosti.			

5. RASPRAVA

Infekcijska mononukleoza uzrokovana virusom Epstein-Barr primjer je virusne infekcije kod koje ne dolazi do potpunog iskorjenjivanja uzročnika bolesti iz organizma već do uspostave doživotne latentne infekcije. S obzirom na to, smatra se da je upravo stanična imunost najvažniji efektorski mehanizam imunološkog sustava odgovoran za kontrolu virusne replikacije. Dijagnoza infekcijske mononukleoze najčešće se postavlja klinički, a potvrđuje serološki (Đaković-Rode i sur., 2005).

Ovim istraživanjem analizirana je distribucija glavnih limfocitnih subpopulacija periferne krvi u osoba sa serološki i molekularno dokazanom infekcijskom mononukleozom uzrokovanom EBV-om (mjerljiva EBV DNA u krvi ispitanika). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da EBV infekcija koja se klinički prezentira kao infekcijska mononukleoza značajno mijenja kvantitativne odnose subpopulacija limfocita T, limfocita B, pomoćničkih CD4⁺ limfocita T, citotoksičnih CD8⁺ limfocita T i aktiviranih CD8⁺CD38⁺ i HLA-DR⁺ limfocita T u perifernoj krvi. U svih ispitanika s infekcijskom mononukleozom uzrokovanom EBV-om postoci CD8⁺ limfocita T i aktiviranih CD8⁺CD38⁺ i HLA-DR⁺ limfocita T bili su iznad gornje granice referentnih vrijednosti. Postoci limfocita T, CD4⁺ limfocita T i limfocita B u perifernoj krvi ispitanika s infekcijskom mononukleozom statistički se značajno razlikuju od referentnih vrijednosti. U ispitanika s kliničkom dijagnozom infekcijske mononukleoze apsolutni broj CD4⁺ limfocita T i postoci stanica NK periferne krvi ne pokazuju statistički značajna odstupanja od referentnih vrijednosti.

Židovec-Lepej i suradnici su 2003. godine proveli istraživanje u kojem su analizirali raspodjelu limfocita u perifernoj krvi bolesnika s infekcijskom mononukleozom uzrokovanom EBV-om ili ljudskim citomegalovirusom (*Human citomegalovirus*, hCMV) i istražili mogućnost dijagnostičke koristi panela za protočnu citometriju kojeg preporuča Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) kod HIV-1 infekcije. Kod bolesnika sa tipičnim i atipičnim simptomima infekcijske mononukleoze uzrokovane EBV-om utvrdili su značajno veće postotke ukupnih limfocita T, citotoksičnih CD8⁺ limfocita T i aktiviranih HLA-DR⁺ limfocita T u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom. Postoci CD4⁺ limfocita T bili su statistički značajno smanjeni naspram zdravih kontrola. Apsolutni broj pomoćničkih CD4⁺ limfocita T, kao i postotak limfocita B, statistički se nije značajno razlikovao u usporedbi sa referentnim vrijednostima. Uzorak promjene u raspodjeli limfocita kod bolesnika zaraženih hCMV-om bio je identičan kao i kod bolesnika zaraženih EBV-om, iako manje izražen.

Također su zaključili da su limfocitne populacije zastupljene u panelu za protočnu citometriju kod HIV-1 infekcije dovoljne za dijagnosticiranje infekcijske mononukleoze uzrokovane EBV-om ili hCMV-om.

Samoograničavajuća proliferacija pomoćničkih CD4⁺ i citotoksičnih CD8⁺ limfocita T karakteristična je za akutnu EBV infekciju. Ključne stanice koje uništavaju EBV-om zaražene limfocite B su morfološki promijenjeni, aktivirani CD8⁺ limfociti T čiji se broj u cirkulaciji značajno poveća za vrijeme akutne infekcije (Roos i sur., 2000). Osobita ekspresija molekule CD38 u različitim staničnim populacijama omogućila je primjenu CD38 kao biljega stanica u brojnim patološkim stanjima. Visoke razine ekspresije CD38 pronađene su na aktiviranim limfocitima T, dok limfociti T u nepodraženom stanju ekspimiraju niske razine CD38 (Munoz i sur., 2003).

Lynne i suradnici su 1998. godine proveli istraživanje u kojem su usporedili fenotip CD8⁺ limfocita T u akutnoj EBV infekciji i u infekciji virusom humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*, HIV). Citotoksični CD8⁺ limfociti T sudjeluju u imunskoj kontroli obje infekcije, iako je ishod EBV infekcije najčešće bezopasan, dok je neliječena HIV infekcija smrtonosna. Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajno veće postotke aktiviranih CD8⁺CD38⁺ i HLA-DR⁺ limfocita T u akutnoj EBV infekciji, slično kao i u kroničnoj HIV infekciji. Molekula CD38 koristi se kao prognostički biljeg u HIV infekciji. Povišena ekspresija CD8⁺CD38⁺ limfocita T povezana je sa bržim napretkom bolesti i intenzivnijim smanjenjem broja CD4⁺ limfocita T u HIV pozitivnih pacijenata. CD38 specifično inhibira vezanje gp120 (glikoprotein na površini HIV-a) i CD4 (ciljna stanica) i na taj način sprječava HIV da pristupi ciljnoj stanici (Savarino i sur., 2003).

Židovec-Lepej i suradnici su 2003. godine istraživali ekspresiju CD38 na CD8⁺ limfocitima T kod pacijenata sa infekcijskom mononukleozom uzrokovanom EBV-om ili CMV-om. Istraživanje je pokazalo da kod akutne EBV i hCMV infekcije postoji statistički značajan porast u postotku aktiviranih CD8⁺CD38⁺ limfocita T u usporedbi sa zdravim kontrolama. Ipak, kod akutne infekcije uzrokovane EBV-om zabilježen je znatno veći postotak aktiviranih CD8⁺CD38⁺ limfocita T nego kod infekcije uzrokovane hCMV-om. Istraživanje je također pokazalo da biljeg CD38 može biti od pomoći u diferencijalnoj dijagnostici slučajeva infekcijske mononukleoze s atipičnom kliničkom prezentacijom.

Istraživanjima se također pokušala utvrditi povezanost imunofenotipskih promjena perifernih krvnih limfocita u infekcijskoj mononukleozu s drugim oblicima atipičnih

limfocitoza. Najčešći uzroci limfocitoze su virusne infekcije, kronične upale intracelularnim bakterijama, te akutne i kronične limfocitne leukemije. Hudnall i suradnici su 2003. godine proveli istraživanje kojim su prikazali usporedne imunofenotipske karakteristike kod EBV-pozitivnih i EBV-negativnih atipičnih limfocitoza. Tim istraživanjem utvrdili su statistički značajan porast aktiviranih CD8+ limfocita T i stanica NK, dok su postoci pomoćničkih limfocita T i limfocita B odgovarali referentnim vrijednostima u svim istraživanim atipičnim limfocitozama. Limfocitoze uzrokovane EBV-om karakteriziralo je i povećanje apsolutnog broja limfocita. Nasuprot tome, Karcheva i suradnici su 2008. godine proveli istraživanje kojim su pokazali da su postoci pomoćničkih limfocita T i limfocita B u infekcijskoj mononukleozi uzrokovanom EBV-om značajno smanjeni, uz statistički značajan porast aktiviranih CD8+ limfocita T, stanica NK i aktiviranih HLA-DR+ limfocita T.

Aktivirani CD8+ limfociti T dominantna su skupina limfocita u perifernoj krvi za vrijeme akutne EBV infekcije. Njihova primarna uloga u infekcijskoj mononukleozi uzrokovanom EBV-om je supresija replikacije virusa i citotoksično djelovanje protiv virusom zaraženih stanica. Povećan broj aktiviranih CD8+ limfocita T zabilježen je i kod HIV infekcija, hCMV infekcija, kao i kod hepatitisa C (Tembhare i sur., 2010). Doisne i suradnici su 2004. godine istraživali povezanost statusa aktivacije CD8+ limfocita T specifičnih za EBV, hCMV i virus gripe i HIV-specifičnih CD8+ limfocita T tijekom HIV infekcije. Aktivacijski biljezi CD38 i HLA-DR bili su snažno eksprimirani na HIV-specifičnim CD8+ limfocitima T. Ekspresija CD38 bila je povećana i na CD8+ limfocitima T specifičnim za druge viruse, iako u manjoj mjeri. Ekspresija aktivacijskog biljega vratila se u granice normalnih vrijednosti nakon 1 godine vrlo učinkovite antiretrovirusne terapije (engl. *highly active antiretroviral therapy*, HAART). Dokazali su da je HIV-viremija u korelaciji s ekspresijom CD38 na HIV-specifičnim CD8+ limfocitima T, kao i na CD8+ limfocitima T specifičnim za EBV, hCMV i virus gripe. Istraživanje je pokazalo da se tijekom HIV infekcije aktiviraju „stanice-promatrači“: CD8+ limfociti T specifični za druge viruse, premda HIV-specifični CD8+ limfociti T eksprimiraju najviše razine aktivacije.

Odumade i suradnici su 2012. godine proveli longitudinalno istraživanje kako bi definirali povezanost limfocitoze koja se pojavljuje tijekom akutne infekcije uzrokovane EBV-om i uloge već postojećih memorijskih CD8+ limfocita T specifičnih za hCMV i virus gripe tipa A („stanice-promatrači“). Istraživanje je pokazalo da su se memorijski CD8+ limfociti T specifični za hCMV i virus gripe tipa A uglavnom aktivirali u neznatnoj mjeri, sugerirajući da je snažna CD8+ limfocitoza povezana sa akutnom infekcijom EBV-a

uzrokovana najvećim dijelom EBV-specifičnim limfocitima T. Podaci ovog istraživanja sugeriraju da snažan odgovor CD8⁺ limfocita T stvara nove memorijske stanice bez znatnog oštećivanja već postojećih memorijskih stanica specifičnih za druge virusne infekcije.

Infekcijska mononukleoza uzrokovana EBV-om najčešće prolazi bez komplikacija, a karakterizirana je relativnom i apsolutnom limfocitozom. Praćenje limfocitnih subpopulacija ima velik značaj u dijagnostici infektivnih bolesti. U istraživanju provedenom u ovom diplomskom radu zabilježena je specifična distribucija različitih limfocitnih subpopulacija kod ispitanika s infekcijskom mononukleozom uzrokovanom EBV-om. Analiza distribucije limfocitnih subpopulacija pokazala je povećanje postotka limfocita T i smanjenje postotka limfocita B. Postoci CD8⁺ limfocita T u krvi ispitanika s infekcijskom mononukleozom su povećani, dok su postoci CD4⁺ limfocita smanjeni. Usprkos tome, apsolutni broj CD4⁺ limfocita T nalazi se u granicama referentnih vrijednosti. Povećana ekspresija biljega stanične aktivacije (CD38 i HLA-DR) na limfocitima T također je uobičajena u bolesnika s infekcijskom mononukleozom.

6. ZAKLJUČCI

1. Imunofenotipizacijski profil ispitanika s kliničkom dijagnozom infektivne mononukleoze uzrokovane virusom Epstein-Barr značajno mijenja kvantitativne odnose limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi.
2. U svih ispitanika s infektivnom mononukleozom uzrokovanom EBV-om postoji CD8+ limfocita T i aktiviranih CD8+CD38+ i HLA-DR+ limfocita T bili su iznad gornje granice referentnih vrijednosti.
3. Postoji limfocita T, CD4+ limfocita T i limfocita B u perifernoj krvi ispitanika s infektivnom mononukleozom statistički se značajno razlikuju od referentnih vrijednosti.
4. U ispitanika s kliničkom dijagnozom infektivne mononukleoze apsolutni broj CD4+ limfocita T i postoji stanica NK periferne krvi ne pokazuju statistički značajna odstupanja od referentnih vrijednosti.

7. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2000): Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Company, Philadelphia

Altin JG, Sloan, EK (1997): The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunology and Cell Biology* 75(5): 430-45

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinivić-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjic D (2010): *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb

Balfour HH Jr, Dunmire SK, Hogquist KA (2015): Infectious mononucleosis. *Clinical and Translational Immunology*, 4, e33

Balfour HH Jr, Odumade OA, Schmeling DO, Mullan BD, Ed JA, Knight JA et al. (2013): Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *Journal of Infectious Diseases*, 207: 80–88

Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K (2006): Protočna citometrija u hematologiji. *Paediatrica Croatica*, 50 (Supl 1): 176-182

Begovac J, Božinović D, Lisić M (2008): *Infektologija, Profil*, Zagreb

Bisset LR, Lung TL, Kaelinš M, Ludwig E, Dubs RW (2004): Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *European Journal of Haematology*, Volume 72, Issue 3, str. 203–212

Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE (2012): T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(9): 510–519

Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM (2003): Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 573-9

Chiu W, Rixon FJ (2002): High resolution structural studies of complex icosahedral viruses: a brief overview. *Virus Research* 82: 9–17

Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen JJ (1997): Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *Journal of Pediatrics*,130:388-93

De Paschale M, Clerici P (2012): Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology* 1(1): 31–43

Deaglio S, Zubiatur M, Gregorini A, Bottarel F, Ausiello CM, Dianzani U, Sancho J, Malavasi F (2002): Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood Journal* 99: 2490-2498

de-Thé G, Day NE, Geser A, Lavoué MF, Ho JH, Simons MJ, Sohler R, Tukei P, Vonka V, Zavadova H (1975): Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study - a review. *IARC scientific publications*, (11 Pt 2): 3-16

Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, Sinet M, Venet A (2004): CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *Journal of Immunology* 173(4): 2410-8

Đaković-Rode O, Židovec-Lepej S, Grgić I, Vince A (2005): Imunološki odgovor u infekciji Epstein-Barrovim virusom – pregledni rad. *Infektološki Glasnik*, Vol.25 No.3

Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964): Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 283: 702–703

Fedele G, Frasca L, Palazzo R, Ferrero E, Malavasi F, Ausiello CM (2004): CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction. *European Journal of Immunology* 34: 1342-1350

Fisher BA, Bhalara S (2004): False-positive result provided by rapid heterophile antibody test in a case of acute infection with hepatitis E virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4411

Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Hollsberg P (2004): A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 109(4): 270–275

Hasan M, Beitz B, Rouilly V, Libri V, Urrutia A, Duffy D, Cassard L, Di Santo JP, Mottez E, Quintana-Murci L, Albert ML, Rogge L; for The Milieu Intérieur Consortium (2015): Semi-automated and standardized cytometric procedures for multi-panel and multi-parametric whole blood immunophenotyping. *Clinical Immunology*, S1521-6616(14)00286-1.

Hatton OL, Harris-Arnold A, Schaffert S, Krams SM, Martinez OM (2014): The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunologic Research*, 58(2-3): 268-76

Hess RD (2004): Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3381–3387

Horwitz CA, Henle W, Henle G, Goldfarb M, Kubic P, Gehrz RC et al. (1981): Clinical and laboratory evaluation of infants and children with Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis: report of 32 patients (aged 10-48 months). *Blood*, 57: 933–938

Hsu JL, Glaser SL (2000): Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 34(1): 27-53

Hudnall SD, Patel J, Schwab H, Martinez J (2003): Comparative immunophenotypic features of EBV-positive and EBV-negative atypical lymphocytosis. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 55(1): 22-8

Hutt-Fletcher LM, Lake CM (2001): Two Epstein–Barr virus glycoprotein complexes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 258: 51-64

Janz A, Oezel M, Kurzeder C, Mautner J, Pich D, Kost M, Hammerschmidt W, Delecluse HJ (2000): Infectious Epstein-Barr Virus Lacking Major Glycoprotein BLLF1 (gp350/220) Demonstrates the Existence of Additional Viral Ligands. *Journal of Virology* 74(21): 10142–10152

Johansenn EC, Schooley RT, Kaye KM (2005): Virus (Infectious mononucleosis). U: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ur.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, Philadelphia

Karcheva M, Lukanov TZ, Gecheva S, Slavcheva V, Veleva G, Nachev R (2008): Infectious Mononucleosis - diagnostic potentials. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*

Kieff E, Richinson A (2001): Epstein-Barr virus and its replication. U: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ur.) *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, str. 2512–2573

Kindt T, Goldsby R, Osborne B, Kuby J (2007): Kuby immunology. W. H. Freeman & Company, New York

Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. (2007): Fields virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA

Luzuriaga K, Sullivan JL (2009): Epstein-Barr virus. U: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (ur.) Clinical virology, 3.izd., ASM Press, Washington, DC, str. 521–536

Luzuriaga K, Sullivan JL (2010): Infectious mononucleosis. The New England Journal of Medicine, 362(21): 1993-2000

Lynne JE, Schmid I, Matud JL, Hirji K, Buessow S, Shlian DM, Giorgi JV (1998): Major expansions of select CD8⁺ subsets in acute Epstein-Barr virus infection: comparison with chronic human immunodeficiency virus disease. Journal of Infectious Diseases 177(4): 1083-7

Melzer S, Zachariae S, Bocsi J, Engel C, Löffler M, Tárnok A (2015): Reference intervals for leukocyte subsets in adults: Results from a population-based study using 10-color flow cytometry. Cytometry Part B Clinical Cytometry, doi: 10.1002/cyto.b.21234

Mettenleiter, TC (2002): Herpesvirus Assembly and Egress. Journal of Virology 76(4): 1537–1547

Morissete G, Flamand L (2010): Herpesviruses and chromosomal integration. Journal of Virology 84(23): 12100-9

Morra M, Malavasi F (1998): CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 12: 581-592

Munoz P, Navarro MD, Pavon EJ, Salmeron J, Malavasi F, Sancho J Zubiaur M (2003): CD38 signaling in T cells is initiated within a subset of membrane rafts containing Lck and the CD3-zeta subunit of the T cell antigen receptor. Journal of Biological Chemistry 278: 50791-50802

Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C (2012): Janeway's Immunobiology. Garland Science, New York

Myung-Soo K, Kieff E (2015): Epstein–Barr virus latent genes. *Experimental and Molecular Medicine* 47, e131

Odumade OA, Knight JA, Schmeling DO, Masopust D, Balfour HH Jr, Hogquist KA (2012): Primary Epstein-Barr virus infection does not erode preexisting CD8⁺ T cell memory in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 209(3): 471-8

Paul JR, Bunnell WW (1932): The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *American Journal of the Medical Sciences*, 183: 90–104

Raab-Traub N (2002): Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Seminars in Cancer Biology* 12(6):431-41

Rakušić S, Vince A, Židovec S, Čulig Z, Lepur D, Miše B (2000): Vrijednost imunofenotipizacijskog profila limfocita periferne krvi u dijagnostici sindroma infektivne mononukleoze (CMV, EBV). *Infektološki Glasnik*, 20(1): 5-7

Reis e Sousa C (2004): Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion In Immunology* 16 (1): 21-5

Roos MT, van Lier RA, Hamann D, Knol GJ, Verhoofstad I, van Baarle D, Miedema F, Schellekens PT (2000): Changes in the composition of circulating CD8⁺ T cell subsets during acute Epstein-Barr and human immunodeficiency virus infections in humans. *Journal of Infectious Diseases* 182(2): 451-8

Savarino A, Bensi T, Chiochetti A, Bottarel F, Mesturini R, Ferrero E, Calosso L, Deaglio S, Ortolan E, Buttò S, Cafaro A, Katada T, Ensoli B, Malavasi F, Dianzani U (2003): Human CD38 interferes with HIV-1 fusion through a sequence homologous to the V3 loop of the viral envelope glycoprotein gp120. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 17: 461-463

Shapiro HM (2003): *Practical Flow Cytometry*. Wiley-Liss Inc., New York

Sitki-Green D, Covington M, Raab-Traub N (2003): Compartmentalization and Transmission of Multiple Epstein-Barr Virus Strains in Asymptomatic Carriers. *Journal of Virology* 77(3): 1840–1847

Taylor GS, Long HM, Brooks JM, Rickinson AB, Hislop AD (2015): The Immunology of Epstein-Barr Virus-Induced Disease. *Annual Review of Immunology*, 21:33:787-821.

Tembhare P, Ramani M, Syed K, Gupta AD (2010): Immunophenotypic Profile in Acute Infectious Mononucleosis Mimicking Malignant Lymphoproliferative Disorder: A Case Report and Review of Literature. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* 26(3): 118–121

Thompson MP, Kurzrock R (2004): Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical Cancer Research* 10(3): 803-21

Vince A, Dušek D (2006): Herpesvirusi kao uzročnici spolno prenosivih bolesti – pregledni rad. *Medicus*, Vol.15 No.2, str. 317-326

Wiesel M, Walton S, Richter K, Oxenius A (2009): Virus-specific CD8 T cells: activation, differentiation and memory formation. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117(5-6): 356-81

Young LS, Arrand JR, Murray PG (2007): EBV gene expression and regulation. U: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (ur.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, str. 461-489

Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Bühring HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X (2007): CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *Journal of Immunological Methods* 318 (1–2): 1–5

Židovec Lepej S, Vince A, Đaković Rode O, Remenar A, Jeren T (2003): Increased numbers of CD38 molecules on bright CD8+ T lymphocytes in infectious mononucleosis caused by Epstein–Barr virus infection. *Clinical and Experimental Immunology* 133(3): 384–390

Židovec Lepej S, Vince A, Rakušić S, Đaković Rode O, Sonicki Z, Jeren T (2003): Center for Disease Control (CDC) flow cytometry panel for human immunodeficiency virus infection allows recognition of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Croatian Medical Journal* 44(6): 702-6

http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v9/n9/fig_tab/nrclinonc.2012.111_F1.html

pristupljeno 15.01.2016.

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/The_Role_of_Epstein-Barr_Virus_in_Burkitt's_Lymphoma pristupljeno 18.01.2016.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Nives Mateljak
Rođena: 19.12.1991. u Metkoviću
Adresa: Ante Starčevića 13, 23500 Metković
E-mail adresa: nivesmateljak@net.hr

Obrazovanje:

2013.-2016. Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb, odsjek biologija, diplomski smjer
Eksperimentalna biologija, modul Fiziologija i imunobiologija

2010.-2013. Prirodoslovno-matematički fakultet Split, preddiplomski studij: Biologija i
kemija

Diploma: univ. bacc. biol. et chem.

2006.-2010. Jezična gimnazija, Metković

Profesionalno iskustvo:

- izrada diplomskog rada u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju,
Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

Osobne vještine i kompetencije:

- napredno poznavanje engleskog jezika
- poznavanje njemačkog jezika
- vladanje Office paketom i drugim standardnim računalnim aplikacijama
- vozačka dozvola B kategorije