

Solubilni Fas i transformirajući faktor rasta beta 2 u infekcijama uzročnicima virusnih i bakterijskih zoonoza

Mateja JANKOVIĆ¹), dr. med.
Ljiljana CEBALO²), dr. med.
Oktavija ĐAKOVIĆ-RODE³), mr. sc., dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije
Zoran MILAS⁴), doc. dr. sc., dr. vet. med.
Nenad TURK⁴), doc. dr. sc., dr. vet. med.
Alemka MARKOTIĆ³), doc. dr. sc., dr. med.

- ¹) Klinička bolnica za plućne bolesti »Jordanovac«, Zagreb
²) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb
³) Klinika za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihaljević«, Zagreb
⁴) Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi

zoonoze
sFas
TGF- β 2

Key words

zoonoses
sFas
TGF- β 2

Primljeno: 2006–11–23

Received: 2006–11–23

Prihvaćeno: 2006–12–15

Accepted: 2006–12–15

Uvod

Zoonoze su bolesti koje se sa životinja (kralježnjaka) prenose na ljude i obrnuto [1]. U našem radu smo se usredotočili na sljedeće virusne i bakterijske zoonoze: virusni krpeljni meningoencefalitis (KME), Lyme boreliozu (lajmska boreliozna), hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS) i leptospirozu. Lajmska boreliozna i KME dvije su važne zoonoze na našem području kojima kao vektor u transmisiji služi krpelj. Virus KME (KMEV) spada u rod flavivirusa (porodica *Flaviviridae*) koji se

može podijeliti u stotinjak različitih serotipova. Bakterije iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato su gram-negativne bakterije spiralnog oblika i spadaju u porodicu *Spirochaetaceae*. Leptospiroze i HVBS su zoonoze rasprostranjene širom svijeta [2–4] i predstavljaju važan javnozdravstveni problem. Leptospiroza je bolest koju uzrokuju mikroorganizmi iz roda *Leptospira*. Ljudi se najčešće zaraze u kontaktu s kontaminiranim tlom i vodom, a rezervoar uzročnika su glodavci (štakori, miševi i voluharice). Kliconoše mogu biti različite vrste oboljelih životinja u rekonvalescenciji, npr. pas, govedo i svinja koji lep-

Znanstveni članak

Određivali smo razine sFas (signalna receptor molekula koja biva otpuštena tijekom apoptoze u cirkulirajućem obliku) i TGF- β 2 (multifunkcionalni citokin) u bolesnika s različitim zoonozama. Serumi su dobiveni od bolesnika hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihaljević«, Zagreb, Hrvatska, s dijagnozama: hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom – HVBS (n=20), leptospiroza (n=9), boreliozna (n=7) ili krpeljni meningoencefalitis – KME (n=7). Za mjerenje razina sFas i TGF- β 2 u serumima koristili smo ELISA kitove prema uputama proizvođača. Značajno povišena razina sFas je nađena u svih bolesnika. Ipak, bolesnici s KME ili boreliozom imali su značajno niže razine nego bolesnici s leptospirozom. Nasuprot tome, bolesnici s KME ili boreliozom su imali značajno više razine TGF- β 2 nego zdrave kontrole. Naši preliminarni podaci ukazuju da bi povišene razine sFas i TGF- β 2 mogle imati ulogu u imunopatogenezi ispitivanih virusnih i bakterijskih zoonoza.

Soluble FAS and transforming growth factor beta 2 in infections with viral and bacterial zoonoses

Scientific paper

We determined levels of sFas (signal receptor molecule released during apoptosis in a soluble circulating form) and TGF- β 2 (multifunctional cytokine) in patients with different zoonoses. Serum samples were obtained from patients hospitalized at the University Hospital for Infectious Diseases, Zagreb, Croatia with diagnoses of hemorrhagic fever with renal syndrome – HFRS, (n=20), leptospirosis (n=9), Lyme borreliosis (n=7), or tick-borne encephalitis – TBE (n=7). In all sera samples the levels of sFas or TGF- β 2 levels were measured using ELISA kits according to the manufacturer's protocol. Significant increase in the levels of sFas was found in all patients. However, the patients with TBE or Lyme borreliosis had significantly lower levels than patients with leptospirosis. In contrary, patients with TBE or Lyme borreliosis had significantly higher levels of TGF- β 2 than healthy controls. Our preliminary data indicate that an increase of sFas and TGF- β 2 levels may have a role in the immunopathogenesis of tested viral and bacterial zoonoses.

tospire izlučuju urinom. Hantavirusi spadaju u porodicu *Bunyaviridae*, a poznato je više od 20 vrsta. Hrvatska je endemsko područje za hantaviruse. Rezervoari ovih uzročnika u prirodi su mali glodavci koji virus izlučuju urinom, fecesom i slinom. Udisanje zaraženog aerosola dokazan je način zaraze u ljudi [3].

Imunopatogeneza virusnih i bakterijskih zoonoza

Obrambena reakcija organizma u lajmskoj bolesti najčešće započinje u koži. Fagocitoza potiče snažnu upalnu reakciju pa aktivirani makrofazi luče proinflamatorne citokine: faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α), interleukin (IL-) 1, IL-6 [7, 8] i kemokine (IL-8, CCL2) [7–9]. Nedavno je pokazano da borelije mogu inducirati apoptozu limfocita koja je vjerojatno posredovana Fas-om [10], a pretpostavlja se da u imunopatogenezi artritisa važnu ulogu ima citotoksično djelovanje gama-delta T-limfocita također posredovano Fas-om [12]. U pokusu na majmunima nađeno je da lipoproteini *B. burgdorferi* potiču i proliferaciju i apoptozu astrocita [11]. KMEV se prvo umnožava lokalno u stanicama kože, odakle nalazi put do regionalnih limfnih čvorova i dalje do krvotoka. U akutnoj fazi infekcije povišene su serumske razine citokina: IL-1 α , IL-6 i TNF- α , a razina IL-10 raste tijekom nekoliko tjedana [13]. Mehanizmi imunoreakcija usmjereni su na uništavanje virusom zaraženih stanica putem citotoksičnih T-limfocita. Iako je u nekim pokusima na stanicama i miševima [14] pokazano da flavivirusi izazivaju apoptozu, njezini mehanizmi još uvijek nisu jasni. Pokazano je da citoliza igra ključnu ulogu u invaziji flavivirusa u središnji živčani sustav. Pretpostavlja se da bi važnu ulogu u tome mogli imati putevi posredovani Fas-om ili egzocitozom granula [15]. Iako hantavirusi inficiraju brojne stanične linije i primarne stanične kulture, postojalo je uvjerenje da oni ne uzrokuju citopatski učinak (CPE). Nedavna istraživanja su pokazala da hantavirusi izazivaju CPE i apoptozu u HEK293 stanicama [18]. Također je pokazano da nukleokapsidni protein hantavirusa ima ulogu u Fas-om posredovanoj apoptozi [19]. Monociti/makrofagi su također ciljane stanice, koje mogu imati važnu ulogu u širenju hantavirusa s mjesta primarne infekcije [16, 17]. I endotelne stanice i monociti/makrofagi mogu tijekom infekcije biti bogat izvor citokina/kemokina te dodatno utjecati na imunopatogenezu HVBS/HPS. Novija klinička istraživanja su upozorila na važnu ulogu proinflamatornih citokina u imunopatogenezi HVBS/HPS [16, 17, 20]. Nema puno podataka o imunopatogenetskim mehanizmima u infekcijama leptospirama. U serumima bolesnika s leptospirozom nalazimo povišene razine TNF- α , za što bi mogao biti odgovoran peptidoglikan leptospire [22]. Vanjski proteini ovojnice patogenih leptospira u kulturi bubrežnih tubularnih stanica mogu dovesti do povišene ekspresije MCP-1 i TNF- α [23, 24]. Također je pokazano da glikoprotein patogenih i nepato-

genih leptospira može inducirati produkciju IL-10 u perifernim mononuklearima zdravih davalaca [25].

Apoptoza

Apoptoza je programirana stanična smrt koju uzrokuje različiti čimbenici koji oštećuju stanicu i jedan je od glavnih kontrolnih mehanizama pri imunoreakcijama i održavanju homeostaze u višestaničnih organizama. Različite bakterije i virusi utječu na mehanizme apoptoze [18, 26]. Čimbenici koji pokreću apoptozu su: nepostojanje fiziološke stimulacije faktorima rasta, okolnim stanicama ili staničnim matriksom; ireverzibilna oštećenja DNK ili staničnog ciklusa i aktivacija nekih membranskih receptora, kao što su receptori za TNF- α – TNF R1, te strukturno sličan Fas receptor [26].

Transformirajući faktor rasta beta

Transformirajući faktor rasta beta (TGF- β) je multifunkcionalni citokin u superfamiliji faktora rasta, diferencijacije i morfogeneze. Brojni su njegovi učinci u stanicama i tkivima kao što su: kontrola staničnog ciklusa, regulacija ranog razvoja, diferencijacija, stvaranje ekstracelularnog matriksa, hematopoeza, angiogeneza, kemotaksija, imunoreakcije i regulacija apoptoze [27–29]. TGF- β može imati o vrsti stanica ovisnu sposobnost inhibicije, ali isto tako i stimulacije stanične proliferacije. Na taj način može imati i anti- i pro-apoptotički učinak. U tkivima sisavaca nalazimo ekspresiju tri izoforme TGF- β . TGF- β 2 ima nekoliko osnovnih aktivnosti: inhibitor je rasta mnogih tipova stanica; pojačava ulaganje ekstracelularnog matriksa; može djelovati immunosupresivno suprimirajući ekspresiju IL-12 i CD40L u antigen-prezentirajućim stanicama, a pojačavajući sekreciju IL-10 [27–29].

Solubilni Fas

Transmembranski receptor Fas/Apo-1 zajedno sa svojim ligandom Fas ligand (FasL) važan je pokretač apoptoze. Osim na limfocitima, Fas je ekspimiran na neutrofilima, monocitima i makrofagima, čija apoptoza može igrati ulogu u rezoluciji upalne infiltracije [26]. Značajka solubilnog Fas (sFas) je nedostatak fragmenta koji bi omogućio njegovo pričvršćivanje za staničnu ovojnicu. On predstavlja antagonist membranskom Fas-u (Fas/Apo-1 receptor), te sprječava apoptozu inhibirajući vezanje Fas-a s FasL ili sFasL [30]. Uloga sFas/Apo-1 nije potpuno jasna, ali se pretpostavlja da je to inhibicija Fas-om posredovane apoptoze u limfocitima putem kompetitivnog vezanja za FasL [26, 30]. Njegova koncentracija u serumu ne korelira s ekspresijom Fas-a na površini stanične ovojnice [31].

Ciljevi našeg istraživanja bili su odrediti razine sFas-a i TGF- β 2 u akutnoj fazi virusnih i bakterijskih zoonoza

koje se endemski javljaju na području Hrvatske i mogu predstavljati diferencijalno dijagnostički problem te ispitati postoji li mogućnost korištenja testiranih parametara u nespecifičnoj diferencijalnoj dijagnostici spomenutih zoonoza. Nadalje, željeli smo procijeniti ulogu sFas-a i TGF- β u imunopatogenezi virusnih i bakterijskih zoonoza i pratiti dinamiku sFas-a i TGF- β tijekom bolesti u bolesnika s HVBS-om.

BOLESNICI I METODE ISPITIVANJA

Bolesnici

Testirali smo serume bolesnika u akutnoj fazi virusnih i bakterijskih zoonoza: HVBS (n=20), KME (n=7), leptospiroze (n=9) i borelioze (n=7) i zdravih kontrola (n=8). U bolesnika s HVBS-om, dodatno smo testirali tri uzastopna seruma tijekom razvoja bolesti i ranoj fazi oporavka, kako je opisano u tablici 1. Većina ispitanika su bili muškarci (>90%).

Tablica 1. Detekcija sFas ili TGF- β 2 u tri uzastopna seruma bolesnika s dokazanim HVBS-om

Table 1. Detection of sFas or TGF- β 2 in three consecutive sera in patients with HFRS

Serum/Serum	Broj seruma/ No of tested sera	Dan bolesti/Day after the HFRS onset
I	20	3–7
II	19	8–15
III	5	16–30

Metode ispitivanja

Serološki testovi u detekciji hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom

Serume bolesnika smo testirali ELISA IgM- (»capture«) testom s antigenima Hantaan 76–118 (HTN) i Puumala CG 18–20 (PUU) i ELISA IgG-testom, s antigenima Hantaan 76–118 (HTN), Puumala CG 18–20 (PUU) i Dobrava 907/5 (DOB) (Regionalni centar Svjetske zdravstvene organizacije za HVBS, Ljubljana, Slovenija).

Rezultate smo čitali spektrofotometrijski na valnoj dužini od 450 nm. Rezultat testa smo smatrali pozitivnim, ako njegova OD-vrijednost prelazi srednju vrijednost plus tri standardne devijacije u odnosu na kontrolu [5].

Serološki testovi na leptospirozu, krpeljni meningoencefalitis i boreliozu

Antitijela na leptospire su u testiranim serumima dokazana testom mikroskopske aglutinacija s 12 serovara

(antigena) u Laboratoriju za leptospire, Veterinarskog fakulteta u Zagrebu [21]. Akutne infekcije KMEV i borelijama dokazane su komercijalnim ELISA IgM testovima prema uputama proizvođača (KME – Genzyme Virotech, Njemačka; lajmska boreliozu – Biomedica, Austrija), a za borelije još i western blot testom (Mikrogen, Njemačka).

Određivanje sFas i TGF- β 2 ELISA-testom

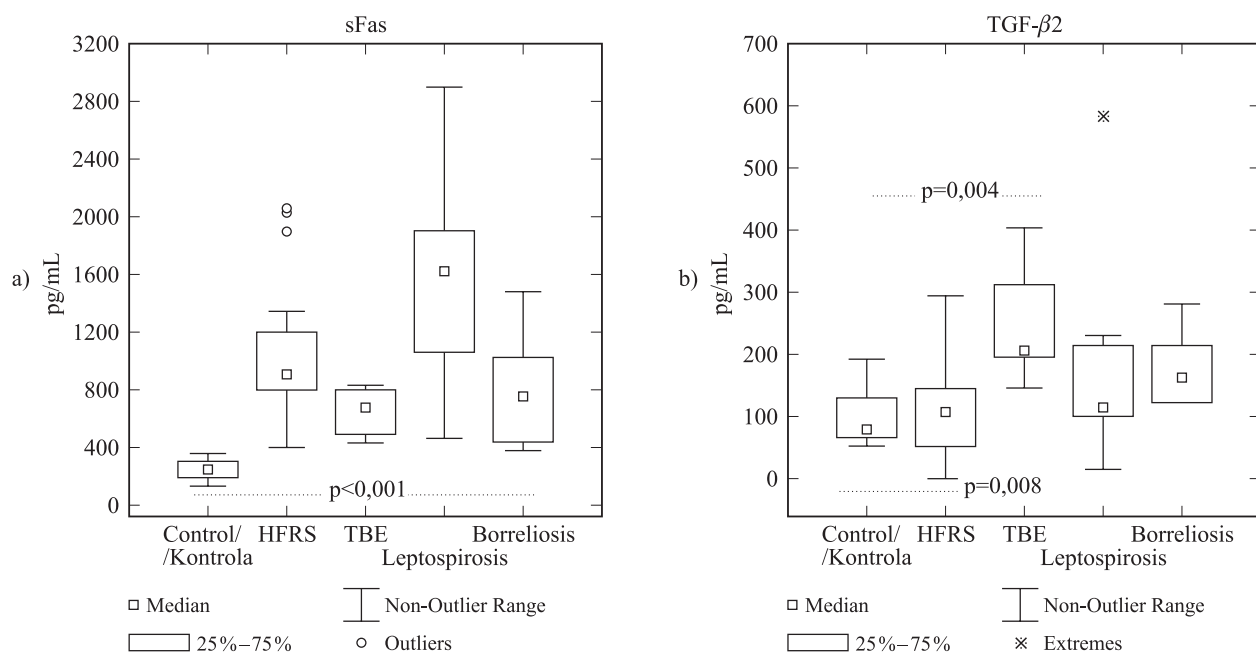
sFas testirali smo koristeći ELISA-set (OptEIA Set: Human sFas, Pharmingen, San Diego, CA, SAD) prema uputama proizvođača. TGF- β 2 određivali smo koristeći ELISA kit (Quantikine Human TGF- β 2 Immunoassay, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, SAD) prema uputama proizvođača.

Statistička analiza

U analizi rezultata smo koristili deskriptivnu statistiku, te neparametrijske testove Friedman ANOVA & Kendall's concordance i Mann-Whitney U test uz Holmovu korekciju. Usporedba tri testirane skupine u analizi promjena u razini sFas i TGF- β 2 u tri uzastopna seruma u bolesnika s HVBS-om, izvršena je korištenjem Friedman ANOVA & Kendall's concordance testa. Usporedba svih mjerenih parametara u bolesnika prema zdravim kontrolama, izvršena je Mann-Whitney U test uz Holmovu korekciju. Korelacija između razina sFAS i TGF- β 2 u tri uzastopna seruma u bolesnika s HVBS-om izvršena je korištenjem Pearson Product-Moment Correlation testa.

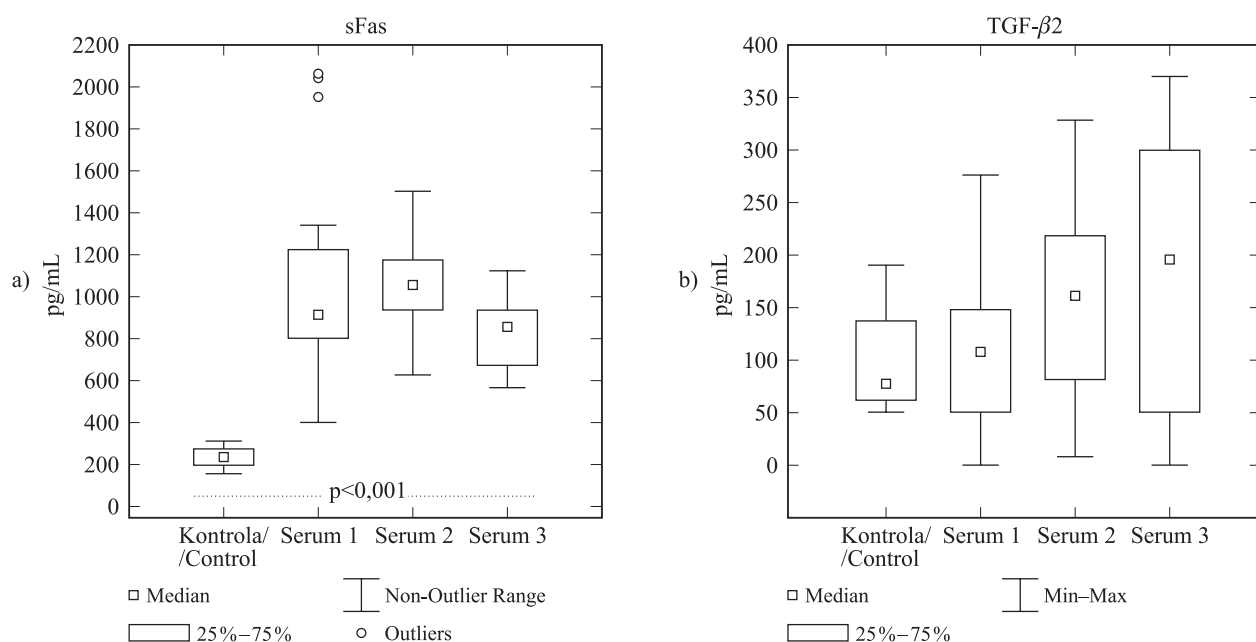
Rezultati

Uspoređujući vrijednosti serumskog sFas u bolesnika s akutnim stadijem virusnih i bakterijskih zoonoza, pokazali smo da su vrijednosti u svih bolesnika bile značajno povišene ($p < 0,001$) u odnosu na vrijednosti u zdravim kontrola (slika 1a). Serumске razine TGF- β 2 su naprotiv bile najviše u bolesnika s KME koji su imali značajno više vrijednosti u odnosu kako na zdrave kontrole ($p = 0,008$), tako i na bolesnike s HVBS ($p = 0,004$) (slika 1b). U bolesnika s HVBS-om smo pratili i dinamiku oba ispitivana parametra (slika 2). Vrijednosti sFas su tijekom cijele bolesti bile statistički značajno više u odnosu na zdrave kontrole ($p < 0,001$). Najviše vrijednosti zapažamo u razdoblju od osmog do 15. dana bolesti (2. serum), a nakon toga slijedi postepeni pad u sljedećih 15 dana (slika 2a). Iako vrijednosti TGF- β 2 nisu bile značajno povišene u odnosu na zdrave ispitanike, zapažamo tendenciju porasta vrijednosti od početka prema kraju bolesti (slika 2b). Uspoređujući razine sFas i TGF- β 2 u različitim fazama bolesti nismo našli korelaciju među ovim parametrima. Dinamiku vrijednosti oba parametra pokazali smo i u serumu bolesnika s HVBS-om, inficiranim virusom Do-



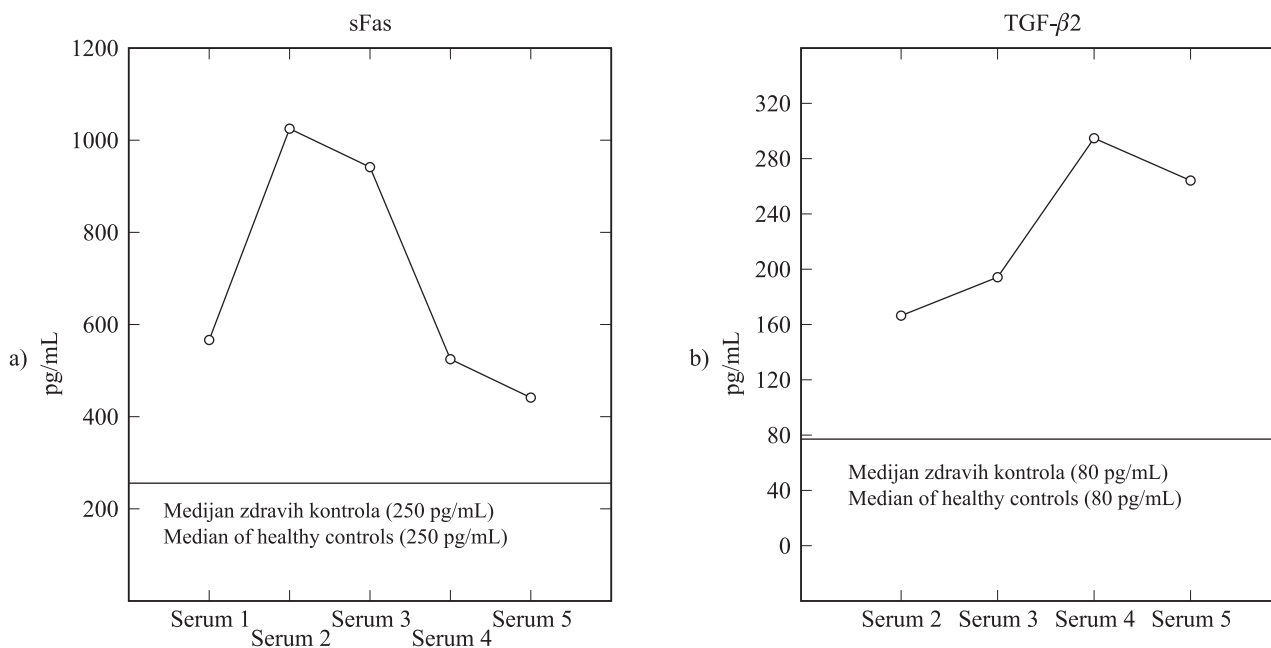
Slika 1. Razine sFas i TGF- β 2 u bolesnika s virusnim i bakterijskim zoonozama. a) Statistički značajno viša razina sFas nađena je u serumima svih bolesnika u odnosu na zdrave kontrole ($p < 0,001$). Najveća koncentracija sFas nađena je u bolesnika s leptospirozom. b) Bolesnici s KME imali su statistički značajno višu razinu TGF- β 2 u odnosu na zdrave kontrole ($p = 0,008$) i bolesnike s HVBS ($p = 0,004$)

Figure 1. Levels of sFas and TGF- β 2 in patients with viral and bacterial zoonoses. a) Significantly higher levels of sFas were detected in sera of all patients compared to healthy controls ($p < 0.001$). Patients with leptospirosis had the highest level of sFas. b) Patients with TBE had significantly higher level of TGF- β 2 in comparison to healthy controls ($p = 0.008$) and HFRS patients ($p = 0.004$)



Slika 2. Razina sFas i TGF- β 2 u tri uzastopna seruma bolesnika s HVBS. a) U usporedbi sa zdravim kontrolama, u bolesnika s HVBS smo našli povišene razine sFas tijekom cijelog trajanja bolesti s vršnom vrijednošću u drugom serumu (~2 tjedna nakon nastupa HVBS). b) Iako nismo našli značajnih razlika između razine TGF- β 2 u tri uzastopna seruma, primijetili smo da vrijednosti imaju tendenciju porasta u usporedbi sa zdravim kontrolama

Figure 2. Levels of sFas and TGF- β 2 in three consecutive serums of patients with HFRS. a) In comparison to healthy controls, in HFRS patients we found significantly increased sFas levels during the course of diseases with the peak level at the second sera (~ two weeks after the onset of HFRS) ($p < 0.001$). b) Although there was no significant difference in the levels of TGF- β 2 between the three consecutive sera, we observed that values have a tendency to increase in comparison to healthy controls



Slika 3. Razine sFas i TGF- β 2 u bolesnika s teškim oblikom HVBS (infekcija virusom Dobrava). Testirano je pet uzastopnih seruma uzetih trećeg (serum 1), desetog (serum 2), šesnaestog (serum 3), dvadesetšestog (serum 4) i pedesettrećeg (serum 5) dana bolesti. a) nakon brzog porasta u prvom serumu, razina sFas polako pada, ali se povišene vrijednosti zadržavaju gotovo dva mjeseca. b) razina TGF- β 2 bila je povišena tijekom akutne faze HVBS i faze oporavka

Figure 3. Levels of sFas and TGF- β 2 in patients with severe form of HFRS (Dobrava virus infection). We tested five consecutive sera samples (serum 1 = 3rd day after the onset (d.a.o.); serum 2 = 10th d.a.o.; serum 3 = 16th d.a.o.; serum 4 = 26th d.a.o.; serum 5 = 53rd d.a.o.). a) After a rapid increase in the first serum, sFas slowly decreased towards the normal values maintaining elevated levels for almost two months after the onset of HFRS. b) TGF- β 2 level was increased during the acute and convalescent phase of HFRS

brava (slika 3). Bolesnik je imao teški oblik bolesti sa zatajenjem bubrega i općim teškim stanjem, te je dulje vrijeme bio hospitaliziran u jedinici intenzivne skrbi. Serumске razine oba ispitivana parametra smo mjerili do pedesettrećeg dana od početka razvoja bolesti. Serum 1 je uzet trećeg dana bolesti, serum 2 desetog, serum 3 šesnaestog, serum 4 dvadesetšestog, a serum 5 pedesettrećeg dana bolesti. Vrijednosti oba parametra su za cijelo vrijeme bili iznad razine vrijednosti za zdrave kontrole (slika 3a, b), a relativno visoke koncentracije smo mjerili i nakon pedeset dana, iako je postojala tendencija postepenog pada TGF- β 2 (slika 3b) i nešto jačeg pada u razini sFas (slika 3a).

Rasprava

Virusne i bakterijske zoonoze su raširene po cijelom svijetu i predstavljaju značajan globalni javno-zdravstveni problem [1]. Važno je dijagnostički razlikovati te bolesti, no to nije uvijek jednostavno, osobito kad se bolesti pojavljuju na istom zemljopisnom području. Zbog toga se pored specifičnih dijagnostičkih laboratorijskih metoda koristimo brojnim drugim nespecifičnim pretragama, koje nam trebaju pomoći u ranoj i točnoj dijagnozi te brzoj primjeni adekvatne terapije. Iako su se zadnjih dvadesetak godina intenzivirala istraživanja imuno-

patogeneze pojedinih virusnih i bakterijskih zoonoza, još uvijek brojna pitanja ostaju nejasna i neriješena. Analizirajući podatke naše studije pokazali smo da bolesnici kako s virusnim (KME i HVBS), tako i s bakterijskim (boreliozom i leptospirozom) zoonozama imaju tijekom akutne faze bolesti povišene vrijednosti serumskog sFas. Iako su u svih bolesnika vrijednosti sFas bile povišene, najviše razine smo našli u bolesnika s leptospirozom i HVBS-om. Štoviše, vrijednosti u bolesnika s leptospirozom su bile značajno više nego u bolesnika s boreliozom i KME. Ovo je ujedno i prva studija koja opisuje ulogu sFas u imunopatogenezi leptospiroze. Nedavna istraživanja HVBS-a su pokazala da hantavirusi mogu izazvati apoptozu u stanicama majmuskog ili humanog bubrega [18, 19]. No ni tu mehanizmi nisu u potpunosti poznati. U jednoj studiji je pokazano da Fas-put može imati ulogu u imunopatogenezi infekcija uzrokovanih virusom Puumala [19]. S druge strane istraživanja u stanicama HEK293 (epitelne stanice bubrega ljudskog embrija) govore da Fas-put nema značajnu ulogu u mehanizmima apoptoze kod patogenih virusa [18]. Ipak, povišene razine sFas u cirkulaciji bolesnika s HVBS-om, ne samo tijekom akutne faze bolesti, nego i tijekom cijelog trajanja bolesti upućuju na pretpostavku da bi procesi apoptoze posredovani Fas-om mogli imati ulogu u imunopatogenezi HVBS-a, a da bi sFas mogao imati ulogu u održavanju homeostaze svojim

anti-apoptotičkim djelovanjem i kompeticijom s membranskim Fas-om. Ni u imunopatogenetskim istraživanjima KME nemamo dovoljno podataka o mogućoj ulozi Fas-puta i mehanizmima apoptoze. Pretpostavlja se da bi citoliza, koja igra ključnu ulogu u invaziji flavivirusa u središnji živčani sustav mogla biti posredovana Fas-putem ili egzocitozom granula [15]. Nešto više istraživanja u zadnje vrijeme imamo u borelioza. Nedavno je pokazano da borelije mogu izazvati apoptozu limfocita, a pretpostavlja se i da bi u imunopatogenezi artritisa ulogu moglo imati citolitičko djelovanje gama-delta T-limfocita posredovano Fas-om [11]. Štoviše, najnovije istraživanje je pokazalo da u serumu bolesnika s različitim oblicima lajmske borelioze (erythema migrans, artritis, neuroborelioza) postoje povišene razine sFas i sFasL [26]. Razine sFas su bile povišene cijelo vrijeme tijekom bolesti i unatoč primijenjenoj terapiji [26]. U istoj studiji je mjerena razina TGF- β 1, no vrijednosti su bile povišene samo u bolesnika s artritismom i to pred kraj bolesti [26]. Mi smo u našoj studiji određivali serumsku razinu TGF- β 2. U dostupnoj literaturi nismo našli nikakve podatke o mogućoj ulozi TGF- β 2 u imunopatogenezi niti jedne od zoonoza ispitivanih u ovoj studiji. Za razliku od razine sFas, vrijednosti TGF- β 2 su bile najviše u bolesnika s KME, te boreliozom, dok nije bilo značajnog povišenja u odnosu na zdrave ispitanike u bolesnika s HVBS-om i leptospirozom. TGF- β kao što smo već spomenuli može imati pro- i anti-apoptotičko, te proliferativno djelovanje [27–29]. U pokusu na majmunima je nađeno da lipoproteini *B. burgdorferi* potiču i proliferaciju i apoptozu astrocita [11]. Također smo istakli da ekspresiju TGF- β 2 nalazimo i na neuronima i na astrocitima [27–29]. Odgovori na pitanje o mogućoj ulozi TGF- β 2 u proliferaciji i apoptozu astrocita pri infekciji borelijama u ljudi ostaju za neka buduća istraživanja. Povišene vrijednosti TGF- β 2 u obje bolesti u kojih nalazimo neurološke poremećaje, govore o mogućem posredovanju TGF- β 2 u imunoreakcijama u centralnom živčanom sustavu. U jednoj studiji na humanim astrocitima pokazano je da možemo na stanicama tumora naći koekspresiju Fas i FasL, te da u pokušaju izbjegavanja apoptoze, tumorske stanice produciraju imunosupresivne i anti-apoptotičke faktore kao što su TGF- β 2 i Bcl-2 [32]. U jednog bolesnika s teškim oblikom HVBS-a cijelim tijekom bolesti nalazimo povišene razine TGF- β 2 s tendencijom porasta prema fazi rekonvalescencije. Bilo bi zanimljivo razine oba mjerena parametra pratiti dulje vrijeme u bolesnika koji su preboljeli HVBS. Obzirom da u jednog postotka bolesnika možemo kasnije naći kronične sekvele (hipertenzija, kronični poremećaji bubrega) [3] bilo bi važno vidjeti postoji li kakva uloga TGF- β 2 i sFas u takvih bolesnika, te imaju li ovi parametri kakvu prognostičku vrijednost. Nedavna istraživanja su pokazala ubranu apoptozu leukocita u bolesnika s kroničnim bubrežnim bolestima gdje ključnu ulogu mogu imati Fas/FasL sustav [33]. Pokazano je da je razina serumskog

sFas bila povišena u bolesnika s različitim stupnjevima kroničnih bubrežnih bolesti, te da je sFas mogao vezati sFasL, vjerojatno na taj način reducirajući staničnu apoptozu [33]. Uočavamo još jednu zanimljivost. Mogli bismo teorijski očekivati da su isti parametri povišeni u virusnih zoonoza i da se nalaz moguće razlikuje od nalaza u bolesnika s bakterijskim zoonozama. Naprotiv, sFas je bio najviši u klinički sličnih zoonoza od kojih je jedna virusna (HVBS), a druga bakterijska (leptospiroza). Objе bolesti imaju za rezervoare male glodavce. S druge strane, TGF- β 2 je bio povišen u bolesnika s klinički sličnim KME (virusna zoonoza) i boreliozom (bakterijska zoonoza), koje imaju i istog prijenosnika, krpelja (*I. ricinus*). Da bismo objasnili ova opažanja, potrebna su daljnja istraživanja mehanizama apoptoze kako u ljudi tako i u rezervoara i prijenosnika uzročnika ovih virusnih i bakterijskih zoonoza. Ove razlike bismo mogli ograničeno iskoristiti i u diferencijalnoj dijagnostici ispitivanih zoonoza, ali ne samostalno, nego uz ostale kliničke nalaze te specifičnu serološku i molekularnu dijagnostiku.

Zaključak

U našem smo radu pokazali da postoje povišene serumske razine sFas i TGF- β 2, kao i razlike u razini istih parametara među bolesnicima s HVBS, KME, boreliozom i leptospirozom. Povišene serumske razine sFas u akutnoj fazi bolesti u svih ispitivanih zoonoza, kao i njegovo održavanje cijelim tijekom HVBS-a navodi na pretpostavku o njegovoj mogućoj ulozi u anti-apoptotičkim mehanizmima i održavanju fiziološke homeostaze. Naši podaci u pogledu TGF- β 2 nisu dostatni za bilo kakav konačni zaključak, te su potrebna dodatna istraživanja. Njegova je uloga vjerojatno dvojna i pro- i anti-apoptotička, a moguće da TGF- β 2 ima i dvojnu ulogu u imunoreakcijama u CNS-u pri infekcijama KMEV ili borelijama. Nadalje, razina sFas je viša u bolesnika s leptospirozom i HVBS, koje su klinički sličnije i čiji uzročnici kao rezervoare koriste male glodavce, dok je razina TGF- β 2 viša u bolesnika s klinički sličnijim KME i boreliozom, čiji je prijenosnik *I. ricinus*. Kako bi se odredila stvarna vrijednost ovih opažanja, potrebna su daljnja temeljna i klinička istraživanja.

Literatura

- [1] Hankenson FC, Johnston NA, Weigler BJ, Di Giacomo RF. Zoonoses of occupational health importance in contemporary laboratory animal research. *Comp Med* 2003;53:579–601.
- [2] Ko IA, Mitermayer GR, Cibebe MR i sur. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brasil. *Lancet* 1999; 354: 820–5.
- [3] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses. A global disease problem. *Emerg Infect Dis* 1997; 3:95–104.

- [4] Markotić A, LeDuc JW, Hlača D i sur. Hantaviruses are a likely threat to NATO forces in Bosnia and Herzegovina and Croatia. *Nature Med* 1996; 2:269–70.
- [5] Markotić A, Nichol ST, Kuzman I i sur. Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol* 2002; 66:542–51.
- [6] LeDuc JW. Epidemiology of hemorrhagic fever viruses. *Rev Infect Dis* 1989; 11(Suppl 4):730–5.
- [7] Hu LT, Klemperer MS. Host-pathogen interactions in the immunopathogenesis of Lyme disease. *J Clin Immunol* 1997; 17:354–65.
- [8] Sigal LH. Lyme disease: A review of aspects of its immunology and immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1997; 65:63–92.
- [9] Sprenger H, Krause A, Kaufmann A i sur. *Borrelia burgdorferi* induces chemokines in human monocytes. *Infect Immun* 1997; 65:4384–8.
- [10] Sandra P, Gianni P, Mario P, Marilena G, Rossella M, Marina C. lymphocyte apoptosis co-cultured with *Borrelia burgdorferi*. *Microb Pathog* 2003; 35(4):139–45.
- [11] Ramesh G, Alvarez AL, Roberts ED i sur. Pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: *Borrelia burgdorferi* lipoproteins induce both proliferation and apoptosis in rhesus monkey astrocytes. *Eur J Immunol* 2003; 33(9): 2539–50.
- [12] Roessner K, Wolfe J, Shi C, Sigal LH, Huber S, Budd RC. High expression of Fas ligand by synovial fluid-derived gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Immunol* 2003; 170(5):2702–10.
- [13] Atrasheuskaya AV, Fredeking TM, Ignatyev GM. Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clin Exp Immunol*. 2003; 131(1):148–54.
- [14] Isaeva MP, Leonova GN, Kozhemiako VB, Borisevich VG, Maistrovskaia OS, Rasskazov VA. Apoptosis as a mechanism for the cytopathic action of tick-borne encephalitis virus Vopr Virusol. 1998; 43:182–6.
- [15] Licon Luna RM, Lee E, Mullbacher A i sur. Lack of both Fas ligand and perforin protects from flavivirus-mediated encephalitis in mice. *J Virol*. 2002;76:3202–11.
- [16] Markotić A. Imunopatogeneza hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom i hantavirusnog plućnog sindroma. *Acta Med Croatica*. 2003;57:407–14.
- [17] Markotić A, Rabatić S, Gagro A, Sabioncello A, Kuzman I, Dekaris D: Immunopathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in humans. In: *Emergence and Control of Rodent-Borne Viral Diseases (Hantaviruses and Arenaviruses)*. »Les Pensières«, Veyrier- Du-Lac, Annecy, France, 1999, 125–31.
- [18] Markotić A, Hensley L, Geisbert T, Spik K, Schmaljohn C. Hantaviruses induce cytopathic effect and apoptosis in continuous human embryonic kidney cells. *J Gen Virol* 2003; 84: 2197–202.
- [19] Li XD, Makela TP, Guo D, Soliymani R, i sur. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *J Gen Virol* 2002; 83:759–66.
- [20] Markotić A, Gagro A, Dašić G, i sur. Immune parameters in patient with hemorrhagic fever with renal syndrome during the period of incubation and in acute disease. *Croat Med J* 2002;43: 587–90.
- [21] Markotić A, Kuzman I, Babić K, i sur. Double trouble: hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis. *Scand J Infect Dis* 2002; 34:221–4.
- [22] Cinco M, Vecile E, Murgia R, Dobrina P, Dobrina A. Leptospira interrogans and Leptospira peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor α from human monocytes. *FEMS Microbiol Let* 1996; 138: 211–4.
- [23] Yang CW, Wu MS, Pan MJ i sur. Leptospira outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:2017–26.
- [24] Yang CW, Wu MS, Pan MJ. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 (Suppl 5):73–7.
- [25] Diamant D, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun* 2002; 70:1677–83.
- [26] Grygorczuk S, Pancewicz S, Kondrusik M, Świerzbńska R, Zajkowska J, Hermanowska-Szpakowicz T. Apoptosis in *Lyme borreliosis* – a preliminary study. *Med Sci Monit* 2003; 9:449–455.
- [27] Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000. 69: 217–45.
- [28] Derynck R, Jarrett JA, Chen EY i sur. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316: 701–5.
- [29] Franzén P, ten Dijke P, Ichijo H i sur. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with TGF beta type II receptor. *Cell* 1993; 75: 681–92.
- [30] Cheng J, Zhou T, Liu C i sur. Protection from fas-mediated apoptosis by a soluble form of the fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759–62.
- [31] Knipping E, Debatin KM, Stricker K, Heiling B, Eder A, Kramer PH. Identification of soluble APO-1 in supernatant of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias. *Blood* 1995; 85:1562–69.
- [32] Frankel B, Longo SL, Ryken TC. Human astrocytoma co-expressing fas and Fas ligand also produce TGFbeta2 and Bcl-2. *J Neurooncol* 1999; 444:205–12.
- [33] Perianayagam MC, Murray SL, Balakrishnan VS i sur. Serum soluble Fas (CD95) and Fas ligand profiles in chronic kidney failure. *J Lab Clin Med* 2000; 136:320–7.