Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

SUBPOPULACIJA B- i T-LIMFOCITA i NK-STANICA (NKC-NATURAL KILLER CELLS; LGL-LARGE GRANULAR LYMPHOCYTES) U BOLESNIKA S INFEKCIOZNOM MONONUKLEOZOM

NIJAZ SOFTIĆ i TATJANA JEREN

Zavod za hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Zagreb
Klinika za infektivne bolesti »Dr Fran Mihaljević«, Zagreb

UDC 616.988.51/.55

Apstrakt. Kod skupine od 54 bolesnika sa verificiranom dijagnozom infekciozne mononukleoze, u perifernoj krvi su utvrđivane vrijednosti leukocita, limfocita i atipičnih mononuklearnih stanica (AMNS) i vršeno je identificiranje i određivanje broja B-limfocita, T11, T4, T8 limfocita te velikih granuliranih limfocita (VGL; LGL-large granular lymphocytes), odnosno NK-stanica (natural killer cells) odgovarajućim imunološkim testovima.

Maksimalne vrijednosti leukocita periferne krvi ne prelaze cifru od 14 x 10^9/L, a bilježe se u prva tri tjedna bolesti. Limfociti i AMNS čine većinu stanica u diferencijalnoj leukocitnoj formuli. Njihove ukupne maksimalne vrijednosti kreću se do 88%, a najveće su u prva tri tjedna bolesti. Vrijednosti antitijela na VCA (viral capsid antigen) i antitijela na EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) u skladu su sa znanim podacima iz literature.

Testom direktne imunofluorescencije (polivalentna i monovalentna antiimunoglobulinska antitijela) utvrđeno je povećanje vrijednosti B-limfocita, koje je najizraženije u prvom tjednu bolesti. Najčešće su uvećane vrijednosti B-limfocita koji na svojoj membrani nose IgG+IgM+IgA, odnosno IgG+IgM. Uvećanje vrijednosti B-limfocita najvjerojatnije je odraz djelovanja EB virusa kao poliklonskog aktivatora B-stanica, što rezultira njihovom proliferacijom i diferenciranjem.

Testom indirektne imunofluorescencije upotrebom anti-T11, anti-T4 i anti-T8 monoklonskih antitijela, utvrđeno je povećanje vrijednosti T11 limfocita i izrazito uvećanje vrijednosti supresorskih/citotoksičnih T-limfocita (T8) kroz cijelo vrijeme trajanja bolesti. Uočava se i lagana tendencija uvećanja vrijednosti pomoćničkih T-limfocita (T4). Inficiranje B-limfocita EB virusom udruženo je sa intenzivnom imunostimulacijom te aktiviranjem i povećanjem vrijednosti T-limfocita, a prvenstveno onih sa citotoksičnom i supresorskom funkcijom (T8), koji su izgleda i primarno aktivirani. Tendencija laganog uvećanja vrijednosti pomoćničkih T-limfocita (T4) mogla bi biti odraz aktiviranja i te podvrste T-limfocita u akutnoj infekcioznoj mononukleozi.

U preparatima razmaza pune krvi i u preparatima razmaza izdvojenih limfocita te upotrebom monoklonskih NKH$_1$ antitijela utvrđeno je povećanje vrijednosti velikih granuliranih limfocita (VGL; LGL), odnosno NK-stanica, što je u skladu sa rezultatima i drugih istraživača. Povećanje srednjih vrijednosti NK-stanica najizraženije je između petnaestog i tridesetog dana bolesti. Intaktna funkcija NK-stanica preduvjet je za nor-

malnu zaštitu protiv herpes simplex virusa, pa bi se te stanice na sličan način mogle ponašati i protiv Epstein-Barr (EB) virusa. NK-stanice bi mogle djelovati same na EB virusom inficirane B-stanice ulazeći tako odmah u procese obrane, a zajedno sa aktiviranim citotoksičnim T-stanicama, djelovale bi na plazma stanice, čije je pojavljivanje rezultat virusom inducirane transformacije B-limfocita, i eliminirale ih. Supresorski T-limfociti bi ograničavali rast EB virusom inficiranih B-stanica djelujući antiproliferativno.

Ključne riječi: infektivna mononukleoza, subpopulacija B- i T-limfocita, NK-stanice.

UVOD

Infekciozna mononukleoza je uglavnom akutna i obično po toku i trajanju sama po sebi ograničena limfoproliferativna bolest, uzrokovana Epstein-Barr (EB) virusom.

Do nedavna se smatralo da u bolesnika s infekcioznom mononukleozom EB virus inficira primarno B-limfocite, koji za razliku od drugih stanica krvi izražavaju površinski receptor za taj virus. Ovaj receptor je identificiran kao komplement receptor tip 2 (CR2) za cijepanje C3d treće komponente komplementa (1, 2, 3). Međutim, nedavna istraživanja utvrdila su u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom prisutnost EB virusa u epitelnim stanicama orofarinksa. Utvrđeno je također da epitelne stanice, osobito one manje diferencirane, izražavaju površinske receptore za C3d (4). Ove receptor molekule su također poznate u funkciji kao EB virus receptori (2). Orofarinks je, izgleda, uobičajeno mjesto početnog inficiranja EB virusom. Primarna ciljna stanica za infekt ne bi bio B-limfocit, nego epitelne stanice (5, 6) koje mogu vezati i brzo internalizirati EB virus (7). U epitelnim stanicama odvija se i replikacija virusa. Fizička blizina, koja postoji između epitelnih i limfoidnih stanica u farinksu, osigurava da B-limfociti budu na tom mjestu inficirani EB virusom. Migriranje virusom inficiranih B-limfocita u druge limfoidne organe rezultira generaliziranjem infekcije. Istraživanjima Sixbeya, Lemona i Paganoa (8) utvrđeno je da EB virus može biti izlučen iz uterinog cerviksa, što ukazuje na mogućnost infekcije veneričkim putem. EB virus se ponaša kao poliklonski aktivator B-stanica, što rezultira njihovom proliferacijom, diferenciranjem i secerniranjem imunoglobulina. Za kontrolu proliferacije B-stanica odgovoran je stanični imunitetni odgovor, čiji su nosioci T-limfociti. Stanoviti noviji istraživački podaci sugeriraju da bi NK-stanice (natutal killer cells) bile primarno odgovorne za kontrolu infekcije EB virusom (9).

S obzirom da u nastajanju i razvoju infekcije EB virusom sudjeluje kompleksni mehanizam, ispitivanja vršena u ovom radu odnosila su se na izučavanje subpopulacija B- i T-limfocita, podvrsta T-limfocita i populacije NK-stanica identificiranjem i praćenjem vrijednosti ovih stanica kod skupine bolesnika sa infekcioznom mononukleozom.

MATERIJAL — ISPITANICI

Ispitivanja su vršena kod skupine od 54 bolesnika s verificiranom dijagnozom infekciozne mononukleoze (tablica 1). Radilo se o 29 muških i 25 ženskih osoba u životnoj dobi od 5 do 42 godine. Kontrolnu skupinu sačinjavale su 23 odrasle zdrave osobe.

Tablica 1. ISPITIVANI BOLESNICI S INFEKCIOZNOM MONONUKLEOZOM

Ispitanici (n)	Spol		Životna dob — godine	Trajanje bolesti — dani						
	M	Ž		1—6	7—14	15—21	22—30	31—60	61—90	>90
Bolesnici										
54	29	25	5—42	12	10	8	5	10	3	6
Zdrave osobe										
23	10	13	20—23							

METODE

Vršena ispitivanja uključila su pretrage navedene u tablici 2. Kod svih ispitivanih bolesnika načinjene su osnovne kvanitativne i kvalitativne hematološke pretrage te dijagonostički i diferencijalno dijagnostički serološki testovi. Identificiranje i određivanje broja B-limfocita vršeno je testom direktne imunofluorescencije po metodi Grya, Holma, Blotha i Jolanda (10) upotrebom polivalentnih (anti-IgA+IgG+IgM) i monovalentnih (anti,IgA, anti-IgG, anti-IgM) antitijela. Identificiranje i određivanje broja ukupnih T-limfocita (T11), T-helper (T4 i T-suppressor/cytotoxic (T8) limfocita vršeno je testom indirektne imunofluorescencije upotrebom monoklonskih anti-T11, Anti-T4 i anti-T8 antitijela (Boehringer), a po metodi propisanoj od proizvođača. Identificiranje i određivanje vrijednosti velikih granuliranih limfocita (LGL — large granular lymphocytes) odnosno NK-stanica (natural killer cells) vršeno je u preparatima razmaza pune krvi i u preparatima izdvojenih limfocita metodom Kordić, Lukač, Silobrčić, Dekaris i Spaventi (11) te upotrebom 3B8 NKH_1 antitijela metodom Instituta Gustav-Roussy, Villejuif (Francuska).

Tablica 2. PRETRAGE VRŠENE KOD ISPITIVANIH BOLESNIKA I KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA

Pretrage	Vrsta pretrage
Kvantitativne i kvalitativne hematološke pretrage	Veliki hemogram uključujući diferencijalnu leukocitnu formulu na 200 staničnih elemenata u preparatima obojenim Pappenheimovom metodom
Serološki testovi na NBV	RVK, IFT: VCA (viral capsid antigen: IgM i IgG, EA (early antigen), EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen), Monostikon test, RVK na EB virus, IF na EB virus

Diferencijalno-dijagnostički serološki testovi	1. CMV-RVK, Elise: IgM i IgG 2. Listerioza-aglutinacija 3. Tularemija-aglutinacija 4. Adenovirusne infekcije — RVK 5. Toksoplazma: Dye test, RVK, IFT — IgM i IgG, Elise test
Identificiranej i određivanje broja B limfocita	Test direktne imunofluorescencije sa polivalentnim (IgA + IgG + IgM) i sa monovalentnim (anti-IgA anti-IgG anti-IgM) antitijelima, Imunološki zavod, Zagreb
Identificiranje i određivanje broja T-limfocita (T11) i podvrsta T-limfocita (T4 i T8)	Identificiranje funkcionalnih podvrsta T-limfocita testom indirektne fluorescencije sa anti-T11, anti-T4 i anti-T8 monoklonskim antitijelima (Boehringer)
Identificiranje i određivanje broja VGL — velikih granularnih limfocita (LGL — large granular lymphocytes), odnosno NK-stanica (natural killer cells)	Identificiranje LGL — large granular lymphocytes a) u preparatima razmaza periferne krvi b) u preparatima načinjenim nakon izdvajanja limfocita na lymphoprepu. Identificiranje i određivanje broja NK-stanica pomoću NKH_1 (C3B) monoklonskih antitijela

REZULTATI

Vrijednosti leukocita ($x10^9/L$), vrijednosti limfocita (%) i atipičnih mononuklearnih stanica — AMNS (%) dobivene u ispitivanih bolesnika sa infekcioznom mononukleozom navedene su u tablici 3.

Maksimalne vrijednosti leukocita ne prelaze cifru od $14x10^9/L$. Najveće maksimalne vrijednosti leukocita bilježe se u prva tri tjedna bolesti. Limfociti i AMNS čine u prva tri tjedna bolesti 49,1% do 55,6% svih stanica s jezgrom u diferencijalnoj leukocitnoj formuli. Maksimalne vrijednosti ova dva tipa stanica u preparatima razmaza periferne krvi znatno su veće.

Dijagnoza je potvrđena imunofluorescentnim testom (IFT) na virus kapsidni antigen (VCA) Epstein-Barr virusa. Kod svih ispitivanih bolesnika IgG antitijela na VCA su povišena već u samom početku bolesti i tokom bolesti se mogu još povećati, a zatim se smanjuju i u niskom titru zadržavaju tokom cijelog života. IgM antitijela na VCA javljaju se već krajem prvog tjedna bolesti i zadržavaju se četvrtog do osmog tjedna bolesti. U nekih bolesnika ova se antitijela javljaju kasnije (»odgođeni« imunološki odgovor), ili u nekih ostaju negativna, vjerojatno zbog teškoća i velike osjetljivosti u izvođenju testa.

U 20 bolesnika uz antitijela na virus kapsidni antigen rađena su i antitijela na nuklearni antigen — EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen), koja postaju pozitivna tek nakon tri tjedna bolesti i kasnije, a mogu ostati pozitivna doživotna. Kod naših ispitivanih bolesnika antitijela na EBNA javljala su se dosta kasno, češće nakon pet do šest tjedana.

Tablica 3. VRIJEDNOSTI LEUKOCITA, LIMFOCITA I ATIPIČNIH MONONUKLEARNIH STANICA U ISPITIVANIH BOLESNIKA

Bolesnici (n)	Trajanje bolesti (dani)	Vrijednosti leukocita x 10^9/L			Vrijednosti limfocita (Li) %			Vrijednosti atipičnih mononuklearnih stanica (AMNS) %			Li + AMNS %
		raspon	$\bar{x}$	s	raspon	$\bar{x}$	s	raspon	$\bar{x}$	s	
8	1— 6	5,3—12,4	7,9	2,7	19—55	30,9	14,4	11—36	20,7	8,9	51,6
11	7—14	4,1—10,5	7,3	2,2	26—59	37,0	9,5	12—29	18,6	5,8	55,6
8	15—21	6,4—14,0	10,4	2,9	20—40	27,5	8,1	16—27	21,6	4,3	49,1
4	22—30	5,9— 9,9	7,7	2,0	22—39	29,7	7,4	15—21	18,2	2,7	47,9
8	31—60	5,2—10,0	6,8	1,9	28—40	35,1	3,6	11—27	16,6	6,3	51,7
1	61—90		6,5			40,0			20,0		40,0
5	>90	6,0— 7,5	6,8	5,0	25—37	29,8	4,4	9—18	13,2	4,1	43,0
Ukupno 45*)											

*) Za devet bolesnika nepotpuni podaci.

Maksimalne vrijednosti limfocita i AMNS do 88%

Vrijednost B-limfocita u ispitivanih bolesnika prema danu trajanja bolesti prikazane su u tablici 4. Rezultati t-testa i Fisher-testa pokazuju da su u bolesnika, bez obzira na dužinu trajanja bolesti, vrijednosti B-limfocita značajno različite ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Kod 34 od ukupno 39 ispitivanih bolesnika, pojedinačne vrijednosti B-limfocita bile su veće od vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Kod skupine bolesnika sa trajanjem bolesti od jedan do šest dana srednje vrijednosti B-limfocita bile su veće od srednjih vrijednosti tih stanica u ostalih bolesnika s dužim intervalima trajanja bolesti. Na osnovi vrijednosti B-limfocita prema tipu imunoglobulina koje nose na svojoj membrani, uočljivo je da su najčešće uvećane vrijednosti B-limfocita koji nose IgG + + IgM + IgA, odnosno IgG + IgM.

Tablica 4. VRIJEDNOSTI B-LIMFOCITA U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA PREMA TRAJANJU BOLESTI

Ispitanici (n)	Trajanje bolesti (dani)	Vrijednosti B-limfocita u %			Imunoglobulini na membrani B-limfocita	Broj bolesnika
		raspon	$\bar{x}$	s		
Bolesnici:						
8	1— 6	17—45	29,88*	9,42	IgG + IgM + IgA ↗	4
					IgG + IgM ↗	1
					IgG ↗	3
4	7—14	14—34	22,75*	8,38	IgG + IgM + IgA ↗	2
					IgG + IgM ↗	1
					IgG ↗	1
6	15—21	17—36	24,67*	6,62	IgG + IgM + IgA ↗	3
					IgG + IgM ↗	2
					IgG ↗	1
5	22—30	20—27	23,80*	2,59	IgG + IgM + IgA ↗	3
					IgG + IgM ↗	2
8	31—60	18—36	26,00*	6,16	IgG + IgM + IgA ↗	4
					IgG + IgM ↗	3
8	>60	18—38	26,63*	6,26	IgG + IgM + IgA ↗	2
					IgG + IgM ↗	2
					IgG ↗	3
Zdrave osobe:						
23	—	12—22	17,48	2,84	IgG $\bar{x}$ = 13,1%	
					IgM $\bar{x}$ = 12,6%	
					IgA $\bar{x}$ = 6,0%	

* — značajno ($p = 0,05$) u odnosu na kontrolne zdrave osobe

U tablici 5 navedene su vrijednosti T11, pomoćničkih (T-helper, T4) i supresorskih/citotoksičnih (T-suppressor/cytotoxic, T8) T-limfocita. U svih ispitivanih bolesnika utvrđena je značajna razlika ($p = 0,05$) vrijednosti T11 limfocita u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Vrijednosti pomoćničkih (TA) T-limfocita nisu značajno različite u odnosu na vrijednosti istih stanica u kontrolnih zdravih osoba, dok je razlika vrijednosti supresorskih/citotoksičnih (T8) T-limfocita značajna ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba.

Tablica 5. VRIJEDNOSTI T11, T4 i T8 STANICA U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA

Ispitanici (n)		Vrijednosti T-stanica u % raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici 14	T11	54 — 82	72,50*	8,60
Zdrave osobe 10		50 — 74	64,80	7,15
Bolesnici 14	T4	38 — 52	45,14	4,45
Zdrave osobe 10		39 — 50	42,40	3,37
Bolesnici 14	T8	28 — 55	35,93*	8,65
Zdrave osobe 10		18 — 24	20,80	2,35

* — značajno ($p = 0,05$ u odnosu na kontrolne zdrave osobe.

Vrijednost NK-stanica (monoklonska antitijela NKH_1) i vrijednosti VGL (LGL) (preparat razmaza pune krvi, preparat razmaza i izdvojenih limfocita) navedene su u tablici 6. Rezultati analize varijance pokazuju da je razlika između vrijednosti NK-stanica u bolesnika i kontrolnih zdravih osoba značajna ($p = 0,05$) barem za jedan par podataka. Utvrđena je također značajna razlika ($p = 0,05$) vrijednosti velikih granuliranih limfocita (preparat razmaza izdvojenih limfocita) u bolesnika, u odnosu na kontrolne zdrave osobe. Vrijednosti VGL dobivene iz preparata razmaza pune krvi bitno se ne razlikuju od vrijednosti koje su dobivene iz razmaza izdvojenih limfocita.

Tablica 6. VRIJEDNOSTI NK-STANICA (NATURAL KILLER CELLS) U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA

Ispitanici (n)	Metoda	Vrijednosti NK-stanica u % raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici 24	Test imunofluorescencije — 3B8 NKH_1 monoklonska antitijela	10 — 28	15,58*	5,50
Zdrave osobe 10	„	5 — 9	7,40	1,07
		Vrijednost VGL — velikih granuliranih limfocita (LGL — large granular lymphocytes) u %		
		raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici 15	Preparat razmaza nakon odvajanja limfocita na lymphoprepu	15 — 29	20,67*	5,29
Zdrave osobe 15	„	5 — 16	9,00	3,33

* — značajno ($p = 0,05$) u odnosu na kontrolne zdrave osobe.

U tablici 7 navedene su vrijednosti NK-stanica kod ispitivanih bolesnika svrstanih u tri skupine prema danu trajanja bolesti. Izvršeno je testiranje vrijednosti NK-stanica t-testom i F-testom za po dvije skupine od kojih jedna predstavlja zdrave kontrolne osobe a druga ispitivane bolesnike prema danu trajanja bolesti. Vrijednosti NK-stanica su kod bolesnika u sve tri skupine prema danima trajanja bolesti značajno različite ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Nakon provedenog testiranja za po dvije skupine ispitivanih bolesnika od kojih svaku karakterizira različito vrijeme trajanja bolesti, dobiveni podaci pokazuju da su vrijednosti NK-stanica u bolesnika kod kojih je bolest trajala od 15 do 30 dana značajno različite ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod bolesnika sa trajanjem bolesti od 1 do 14 dana. U drugim slučajevima razlike nisu značajne.

Tablica 7. VRIJEDNOSTI NK-STANICA (NATURAL KILLER CELLS) U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA PREMA TRAJANJU BOLESTI

Ispitanici (n)	Trajanje bolesti (dani)	Vrijednosti NK-stanica u %*)		
		raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici				
9	1 — 14	9 — 18	12,56*	3,09
4	15 — 30	14 — 30	20,25*	7,14
11	>30	10 — 28	16,36*	5,39
Zdrave osobe				
10	—	5 — 9	7,40	1,07

*) Test imunofluorescencije — monoklonska antitijela NKH
* — značajno ($p = 0,05$) u odnosu na kontrolne zdrave osobe.

DISKUSIJA

U bolesnika sa infekcioznom mononukleozom vrijednosti leukocita mogu biti normalne ili su umjereno povećane. U diferencijalnoj leukocitnoj formuli glavninu stanica čine limfociti i atipične mononuklearne stanice. Najizraženije uvećanje vrijednosit limfocita i atipičnih mononuklearnih stanica bilježi se u toku prva tri tjedna trajanja bolesti, ali te vrijednosti ostaju visoke sve do šezdesetog dana bolesti. Nalazi vrijednosti IgG i IgM antitijela na VCA odgovaraju znanim podacima iz literature što se odnosi i na vrijednosti antitijela na EBNA, s razlikom da ta antitijela kod nekih ispitivanih bolesnika češće postaju pozitivna nakon pet do šest tjedana trajanja bolesti.

Uvećanje vrijednosti B-limfocita bilježi se kod bolesnika bez obzira na dužinu trajanja bolesti, ali je ono najizraženije u prvom tjednu bolesti. I drugi su autori (12, 13, 14) utvrdili uvećanje vrijednosti B-limfocita u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom, odnosno da se u ranim danima primarne EB virus infekcije povećavaju vrijednosti stanica koje secerniraju antitijela (15). Najčešće su uvećane vrijednosti B-limfocita koji na svojoj površini nose IgG + IgM + IgA odnosno

IgG + IgM. Novim ispitivanjima (16) utvrđeno je u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom značajno uvećanje vrijednosti $CD5^+$ B-limfocita ($CD5^+$ B-stanica je ljudski homolog mišijim $Ly—1^+$ B-stanicama), koji su u uskoj vezi sa stvaranjem autoantitijela. Povećanje vrijednosti B-limfocita u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom odraz je djelovanja EB virusa koji se ponaša kao poliklonski aktivator B-stanica, što općenito rezultira njihovom proliferacijom, diferenciranjem i sekrecijom imunoglobulina. Približno oko 48 sati nakon infekcije B-limfociti počinju proliferirati, a tri ili četiri dana kasnije može se utvrditi secerniranje imunoglobulna. Transformiranje B-stanica inficiranih EB virusom rezultira pojavljivanjem na površini stanice virusom determiniranih neoantigena, a samo inficiranje B-stanica EB virusom udruženo je sa intenzivnom imunostimulacijom. Iako se radi o jako izraženom humoralnom odgovoru, koji se manifestira stvaranjem brojnih za EB virus specifičnih antitijela (direktno protiv virus kapsidnog antigena, ranog antigena i EB nuklearnog antigena) (17), smatra se da je imunitetni stanični odgovor primarno odgovoran za kontrolu infekcije EB virusom (18).

Povećanje vrijednosti ukupnih T-limfocita (T11) i izrazito uvećanje vrijednosti supresorskih/citotoksičnih (T8) T-limfocita bilježi se kroz cijelo vrijeme bez obzira na dužinu trajanja bolesti. Uočava se i tendencija laganog uvećanja pomoćničkih (T4) T-limfocita, ali razlika u odnosu na vrijednosti ovih stanica kod kontrolnih zdravih osoba nije statistički značajna. Izrazito uvećanje vrijednosti supresorskih/citotoksičnih (T8) T-limfocita odraz je, izgleda, prvenstveno njihovog primarnog aktiviranja. Inficiranje B-stanica EB virusom udruženo je sa intenzivnom imunostimulacijom, a obilježje te stimulacije je aktiviranje i povećanje vrijednosti T-limfocita, a prvenstveno T-limfocita sa supresorskom i citotoksičnom funkcijom (17). Razvija se profileracija T-stanica koje su podvrgnute blastičnoj transformaciji, replikaciji i funkcionalnom diferenciranju u odgovoru na specifični EB virusom determinirani neoantigen. Efektorske T-stanice su specifične za B-limfocite inficirane EB virusom. Citotoksična aktivnost T-stanica najizraženija je u akutnoj fazi bolesti i postupno iščezava kod bolesnika u rekonvalescenciji (19). Efektorske T-stanice su specifične za B-limfocite inficirane EB virusom i sprečavaju njihovu proliferaciju.

Uočena tendencija laganog uvećanja vrijednosti pomoćničkih T-limfocita (što je potvrđeno višekratnim ponavljanim određivanjem vrijednosti) u odnosu na vrijednosti tih stanica kod kontrolnih zdravih osoba moglo bi se objasniti činjenicom da nije još potpuno razjašnjeno da li su pomoćnička i citotoksična aktivnost izražene od jedne podvrste aktiviranih pomoćničkih T-stanica, a supresorska i citotoksična aktivnost od jedne podvrste aktiviranih supresorskih T-stanica (13). Ispitivanja M i y a w a k i a i suradnika (20) pokazala su da su obje podvrste T-stanica, T4 i T8-stanice, stimulirane u bolesnika sa infekcioz-

nom mononukleozom. Pojavljivanje ovih dviju podvrsta T-stanica, od kojih obje izražavaju CD45RO (UHL1) antigen (CD45 je član obitelji zajedničkog leukocitnog antigena) u akutnoj fazi infekciozne mononukleoze podrazumijeva njihovu regulatorsku ulogu u kontroli EB virusom inficiranih stanica.

Supresorski i citotoksični T-limfociti djeluju, izgleda, u infekcioznoj mononukleozi u dva smjera ovisno o njihovoj funkciji: reagiraju sa inficiranim B-limfocitima potaknutim virusom na transformaciju i reagiraju sa transformiranim B-limfocitima, odnosno sa iz njih nastalim plazma stanicama. Aktiviranje efektorskih elemenata staničnog imuniteta odnosilo bi se prvenstveno na suppopulaciju supresorskih/citotoksičnih (T11) T-limfocita na populaciju NK-stanica, a, izgleda, i na subpopulaciju pomoćničkih (T4) T-limfocita.

Utvrđeno povećanje velikih granuliranih limfocita (VGL; LGL), odnosno NK-stanica u krvi ispitivanih bolesnika u skladu je sa zapažanjima i drugih autora (17, 21, 22). Povećane srednje vrijednosti NK-stanica u ispitivanih bolesnika u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba bilježe se u različitim intervalima trajanja bolesti, ali je povećanje vrijednosti tih stanica najizraženije između petnaestog i tridesetog dana bolesti. S obzirom da je intaktna funkcija NK-stanica preduvjet za normalnu zaštitu protiv herpes simplex virusa (23), razumljivo je da se one mogu ponašati na sličan način i protiv EB virusa. Izgleda da bi NK-stanice mogle same djelovati direktno na virusom inficirane B-stanice (ulazeći neposredno odmah u procese obrane od infekta), a zajedno sa citotoksičnim T-stanicama na plazma stanice koje nastaju procesom virusom inducirane transformacije B-limfocita.

Citotoksična funkcija T-stanica sposobna je da utječe na tok infekcije EB virusom in vivo (24). NK-stanice bi sudjelovale u pravcu eliminiranja virusom inficiranih B-stanica, a zajedno sa citotoksičnim T-limfocitima, djelovale bi na transformirane B-stanice (plazma stanice) ubijajući ih. Supresorske T-stanice bi ograničavale rast EB virusom inficiranih B-limfocita djelujući antiproliferativno. Budući da je ciljna stanica prije supresije B-stanica nedavno inficirana virusom, a ciljna stanica prije citotoksičnosti je B-stanica aktivirana EB virusom na proliferaciju i secerniranje imunoglobulina, supresivno i citotoksično djelovanje razlikovalo bi se s obzirom na stanje virusom inficirane B-stanice. Ova dva regulatorska mehanizma jedan drugog dopunjuju i tako osiguravaju kontrolu infekcije.

Tokom infekciozne mononukleoze, razvijanjem limfocitne reaktivnosti počinje takozvani »rat limfocita«. U »trupe« imunološke obrane uključeni su T-limfociti i NK-stanice (koje reagiraju sa stanicama u replikacijskom ciklusu od kojih su mnoge nelimfoidne), a njihova meta su stanice koje u replikacijskom ciklusu sadrže EB virus, latentno inficirani B-limfociti, a vjerojatno i sam EB virus. Vidljive manifestacije tog »rata limfocita« su hiperplazija limfocita, infiltracija organa i pojavljivanje atipičnih mononuklearnih stanica.

SUBPOPULATIONS OF B- AND T-LYMPHOCYTES AND NK (NATURAL KILLER) CELLS (LGL-LARGE GRANULAR LYMPHOCYTES) IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Summary

In a group of 54 patients with verified diagnoses of infectious mononucleosis values of leukocytes, lymphocytes and atypical mononuclear cells (AMNC) in the peripheral blood were measured and the number of B-lymphocytes, T11 T4, T8-lymphocytes and large granular lymphocytes (LGL) and NK (natural killer) cells respectively identified and determined by appropriate immunological tests.

Maximal leukocyte values in the peripheral blood did not exceed 14 x x 10^9/1 and were recorded in the first three weeks of the disease. Lymphocytes and AMNC were predominating cells in the differential leukocyte formula. Their maximal values amounted up to 88 per cent and were largest in the first three weeks of the disease. The values of antibodies to VCA (viral capsid antigen) and of antibodies to EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) were in accord with data reported in the literature.

In direct immunofluorescence tests (polyvalent and monovalent anti-immunoglobulin antibodies) we found increased values of B-lymphocytes, whihch culminated in the first week of the disease. In most cases we recorded elevated values of B-lymphocytes which carried on their membranes IgG + IgM + IgA or IgG + IgM. The rise B-lymphocyte values was most likely due to the action of EB virus as polyclonal activator of B-cells resulting in their proliferation and differentiation.

In indirect immunofluorescence tests with use of anti-T11, anti-T4 and anti-T8 monoclonal antibodies we found increased T11-lymphocytes values and marked rise in the values of suppressor-cytotoxic T-lymphocytes (T8) throughout the entire duration of the disease. There was also a mild upward trend in the values of T-helper lymphocytes (T4). Infection of B-lymphocytes with EB virus was accompanied by intensive immunostimulation and the activation of, and increase in the values of, T-lymphocytes, in the first place of those with a cytotoxic and suppressor function (T8), which also seemed to have been primarily activated. The tendency of a light increase in T-helper lymphocytes (T4) values might have been the result of the activation of this subspecies of T-lymphocytes in acute infectious mononucleosis.

In the smears of whole blood and in the smears of separated lymphocytes, and with the use of monoclonal NKH1 antibodies, we found increased values of large granular lymphocytes (LGL) and NK (natural killer) cells, respectively, which tallies with the results reported by other researchers. The increase in the mean values of NK cells was greatest between the fifteenth and thirtieth days of the disease. An intact function of NK cells is a precondition for normal protection against herpes simplex virus, so that these cells would behave in a similar way also against Epstein-Barr (EB) virus. NK cells alone could directly act on EB virus-infected B-cells, thus immediately taking part in defence processes, and could together with activated cytotoxic T-celles act on the plasma cells whose appearance is the result of virus-induced transformation of B-lymphocytes and could eliminate them. T-suppressor lymphocytes would restrict the growth of EB virus-infected B-cells by acting antiproliferously.

LITERATURA

(1) Jondal, M. and Klein, G. (1973): *Surface markers on human B and T lymphocytes.* II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes. J. Exp. Med., 138:1365—1378.

(2) Fingeroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A. and Fearon, D. T. (1984): *Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81:4510—4515.

(3) Frade, R., Barel, M., Ehlin-Hendrikkson, B. and Klein, G. (1985): *Gp 140 the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:1490—1493.

(4) Young, L. S., Sixbey, J. W., Clark, D. and Rickinson, A. B. (1986): *Epstein-Barr virus receptors on human pharingeal epithelia.* Lancet., 1:240—242.

(5) Sixbey, J. W., Vesterinen, E. A., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Walton, L. A. and Pagano, J. S. (1983): *Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro.* Nature, 306:480—489.

(6) Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A. and Pagano, J. S. (1984): *Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells.* N. Engl. J. Med., 310:1225—1230.

(7) Sixbey, J. W., Davis, D. S., Young, L. S., Hutt-Fletcher, L., Tedder, T. T. and Rickinson, A. B. (1987): *Human epithelial cell expression of an Epstein-Barr virus receptor.* J. Gen. Virolog., 68:805—811.

(8) Sixbey, J. W., Lemon, S. M. and Pagano, J. S. (1986): *A second site for Epstein-Barr virus shedding: The uterin cervix.* Lancet, 2:1122—1124.

(9) Klein, E., Ernberg, I., Masucci, M. G., Szigeti, R., Wu, Y. T., Masucci, G. and Svedmyr, E, (1981): *T-cell reponse to B-cells and Epstein-Barr virus antigens in infectious mononucleosis,* Cancer Res., 41: :4210—4215.

(10) Softić, N. (1988): *Hematološke laboratorijske pretrage,* Sveučilišna naklada Liber, Zagreb, str. 322.

(11) Kordić, D., Lukač, J., Silobrčić, V., Spaventi, Š., Dekaris, D. (1986):*Simple enumeration of large granular lymphocytes.* Periodicum Biologorum, 88:248—249. (Supp. 1).

(12) Sheldon, P. J., Papamichail, M., Hemsted, E. H. and Holborow, E. J. (1973): *Thymic origin of atipical lymphoid cells in infectious mononucleosis.* Lancet, 1:1153—115.

(13) Papamichail, M., Sheldon, P. J. and Holborow, E. J. (1974): *T and B cell subbpopulation in infectious mononucleosis,* Clin. Exp. Immunol., 18:1—11.

(14) *Leavell and Thhhorup's (Thorup, O. A. Jr.) Fundamentals of Clinical Haematology* (1987). W. B. Sannders Company, Phyladelphia-London-Thoronto, Fifth Ed., str. 72; 469.

(15) Tosato, G., Magrath, I., Koski, I., Dolly, N. and Blaese, M. (1979): *Activation of suppressor T-cells during Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis.* N. Engl. J. Med., 301:1133—1137.

(16) Hassan, J., Feighery, C., Bresnihan, B., Whelan, A. (1990): *Increased CDS+B cells in patients with infectious mononucleosis.* Brit. J. Haematology, 74:375—376.

(17) Tomkinson, B. E., Maziarz, R., Sullivan, J. L. (1989): *Characterisation of the T cell-mediated cellular cytotoxicity during acute infectious mononucleosis,* J. Immunol., 143:660—670.

(18) Rickinson, A. B. (1986): *Cellular immunological response to the virus infection. In the Epstein-Barr virus.* Epstein, M. A. and Achong, B. G., eds. John Willey and Sons, New-York, str. 75.

(19) Brewster, F. E., Byron, K. S. and Sullivan, J. L. (1985): *Immunoregulation during acute infection with Epstein-Barr virus: Dynamics of interferon and 2'5'-oligoadenylate sinthetase activity.* J. Infect. Dis., 151: 1109—1115.

(20) Miyawaki, T., Kasahara, Y., Kanegane, H., Ohta, K., Yachie, A. and Taniguchi, N. (1991): *Expression of CD45RO(UCHLI) by CHD+ and CD+ T cells as a sign of in vivo activation in infectious mononucleosis,* Clin. Exp. Immunol., 83:447—451.

(21) Tomkinson, B. E., Wagner, D. K., Nelson, D. L. and Sullivan, J. L. (1987): *Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection* J. Immunol., 139:3802—3807.

(22) Williams, M. L., Loughran, P. Jr., Kidd, P. G. and Starkebaum, G. A. (1989): *Polyclonal proliferation of activated suppressor/cytotoxic T cells with transient depression of natural killer cell function in acute infectious mononucleosis,* Clin. Exp. Immunol., 77:71—76.

(23) Lopez, C. (1984): *Natural resistance mechanisms against herpes virus in health and disease, in Rouse,* B. T., Lopez, C. (eds): *Immunobiology of Herpes Simplex Infections,* Boca Raton, F. L. CRC Press, str. 45—64.

(24) Tosato, G. (1989): *Cell-mediated immunity,* in Schlossberg, D.: *Infectious mononucleosis,* Eds. Springer Verlag, str. 100—116.

ANU BiH АНУ БиХ