

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marko G. Janković

**POVEZANOST INFEKCIJE I GENOTIPOVA  
HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA SA  
KLINIČKIM ISPOLJAVANJIMA U BOLESNIKA  
SA HEMATOLOŠKIM MALIGNITETIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Marko G. Janković

**ASSOCIATION BETWEEN THE INFECTION  
AND GENOTYPES OF HUMAN  
CYTOMEGALOVIRUS AND CLINICAL  
MANIFESTATIONS IN PATIENTS WITH  
HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

**Mentor:**

- Profesor dr Tanja Jovanović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju

**Članovi komisije:**

- Profesor dr Maja Čupić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju
- Profesor dr Dragana Vujić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić"
- Profesor dr Dobrila Stanković Đorđević, redovni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Mojim dragim roditeljima, Snežani i Gradimiru.*

**Naziv doktorske disertacije:**

Povezanost infekcije i genotipova humanog citomegalovirusa sa kliničkim ispoljavanjima u bolesnika sa hematološkim malignitetima

**Sažetak:**

Humani citomegalovirus (HCMV) je ubikvitaran patogen. U osoba sa hematološkim malignim bolestima i alogenom transplantacijom matičnim ćelijama hematopoeze (TMČH) HCMV infekcija se smatra jednom od najopasnijih komplikacija.

Varijacije u genima koji kodiraju glikoproteine B (gB) i N (gN), važne u virusnoj replikaciji i imunskom odgovoru, uslovljavaju pojavu različitih genotipova HCMV. Postoje dokazi da varijante ovog virusa igraju bitnu ulogu u patogenezi bolesti, premda nijedna klinička manifestacija nije nedvosmisleno povezana ni sa jednim genotipom. Takođe, za raznolikost u distribuciji HCMV gB i gN genotipova za sada nema definitivnog objašnjenja.

Iako je većina činilaca koji dovode do HCMV infekcije istražena, uloga uzrasta, pola, tipa alogene transplantacije i osnovnog oboljenja (maligna *vs* nemaligna bolest) su retko ispitivane.

Konačno, uloga ovog virusa u genezi malignih bolesti krvi je i dalje nejasna.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje povezanosti infekcije i genotipova HCMV sa kliničkim ispoljavanjima kod bolesnika sa hematološkim malignim bolestima.

Rezultati istraživanja su pokazali da su najčešći genotipovi u populaciji dece kod koje je urađena TMČH gB4 i gN1. Citomegalovirusna infekcija je bila značajno povezana sa bolešću kalema-protiv-domaćina. Serološka analiza je ukazala na moguće protektivno dejstvo HCMV infekcije u odnosu na nastanak B-ćelijskih neoplazija.

Zaključci ove doktorske teze su da postoji neophodnost detaljnijeg ispitivanja molekularne epidemiologije HCMV, kao i odnosa HCMV infekcije i zloćudnih tumora porekla B-ćelija i hematoloških malignih oboljenja uopšte. Ovakva i slična istraživanja bi proširila naša saznanja o kliničkom značaju HCMV infekcije.

**Ključne reči:**

citomegalovirus, glikoprotein B, glikoprotein N, seroprevalencija, alogena transplantacija matične ćelije hematopoeze, hematološka maligna bolest, faktori rizika, kliničke manifestacije, onkoprotekcija

**Naučna oblast:**

Medicina

**Uža naučna oblast:**

Molekularna medicina

UKD broj: \_\_\_\_

**Title of the doctoral dissertation:**

Association between the infection and genotypes of human cytomegalovirus and clinical manifestations in patients with hematological malignancies

**Abstract:**

The human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous pathogen. Cytomegalovirus infection is considered one of the most severe complications in patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

Variations in genes encoding glycoproteins B (gB) and N (gN), important in viral replication and immunity, give rise to different HCMV genotypes. Although there is evidence that these variants play a significant role in disease pathogenesis, no clinical manifestation has been decidedly associated with any genotype. Moreover, the apparent diversity in gB and gN genotype distribution has not been fully elucidated. Albeit most factors leading to HCMV infection have been explored, the role of age, gender, type of allogeneic HSCT and underlying disease (malignancy *vs* non-malignant disease) were rarely studied. Finally, the relation between HCMV infection and blood cancer genesis is yet to be unraveled.

The aim of this doctoral dissertation is to study the association between HCMV infection and genotypes and clinical manifestations in patients with hematological malignancies.

The results have shown gB4 and gN1 to be the most prevalent genotypes in children undergoing HSCT. Viral infection was significantly associated with graft-*vs*-host disease. Serological analysis pointed to a possible protective effect HCMV might proffer against the emergence of B-cell neoplasia.

More detailed studies on HCMV molecular epidemiology are warranted in order to yield a precise gB and gN genotype layout. The association between HCMV infection and B-cell malignancies, especially the tentative safeguarding effect the virus may bestow, should be further investigated. Similar research would expand our understanding of the clinical significance of HCMV infection.

**Key words:**

cytomegalovirus, glycoprotein B, glycoprotein N, seroprevalence, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, hematologic malignancy, risk factors, clinical manifestations, oncoprotection

**Scientific field:**

Medicine

**Scientific subfield:**

Molecular medicine

UDK no.: \_\_\_\_

# Sadržaj

---

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
1.1. Istorijat	2
1.2. Karakteristike HCMV	8
1.2.1. Klasifikacija	8
1.2.2. Struktura viriona	8
1.2.3. Karakteristike i organizacija genoma	12
1.2.3.1. HCMV geni <i>UL55</i> i <i>UL73</i>	14
1.2.3.1.1. <i>UL55</i> i glikoprotein B	14
1.2.3.1.2. <i>UL73</i> i glikoprotein N	14
1.2.4. Transmisija i patogeneza	14
1.2.5. Imunski odgovor domaćina	17
1.2.6. Epidemiologija	17
1.2.7. Spektar oboljenja	18
<b>2. Ciljevi istraživanja</b>	<b>20</b>
<b>3. Materijali i metode</b>	<b>22</b>
3.1. Ispitanici	23
3.1.1. Ispitanici – prospektivna studija kohorte pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena autologna i alogena TMČH	23
3.1.2. Ispitanici – prospektivna studija kohorte pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH	24
3.1.3. Ispitanici – retrospektivna studija slučajeva i kontrola	25
3.1.3.1. Kohorta bolesnika – grupa slučajeva	25
3.1.3.2. Kohorta zdravih ispitanika – kontrolna grupa	25

3.2. Uzorci	26
3.3. Metodologija	26
3.3.1. Etička dozvola	26
3.3.2. Izolacija virusne DNK	27
3.3.3. Detekcija i kvantitacija HCMV DNK	27
3.3.4. Genotipizacija HCMV na <i>UL55</i> i <i>UL73</i> lokusima	28
3.3.5. Serološka ispitivanja	30
3.3.6. Definicije HCMV infekcije	30
3.3.7. Podaci o globanom opterećenju B-limfoidnim neoplazijama – studija slučajeva i kontrola	30
3.3.8. Statistička analiza	31
3.3.8.1. Statistička analiza podataka iz prospektivne studije	31
3.3.8.2. Statistička analiza podataka iz retrospektivne studije slučajeva i kontrola	31
<b>4. Rezultati</b>	<b>32</b>
4.1. HCMV infekcija pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze – prospektivna studija	33
4.1.1. Incidencija HCMV infekcije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena i autologna TMČH	33
4.1.2. Incidencija HCMV infekcije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH	34
4.1.3. HCMV infekcija i kliničke karakteristike u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena i autologna TMČH	34
4.1.4. Viremija u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH	35
4.1.5. Distribucija gB i gN genotipova u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena i autologna TMČH	35
4.1.6. Infekcije sa više HCMV genotipova (mešane infekcije)	37
4.1.7. Korelacija mešanih infekcija i kliničkih manifestacija bolesti u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena TMČH	37



4.1.8. Intra- i intergenotipske asocijacije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH	38
4.1.9. Odnos HCMV genotipskih varijanti i kliničkih komplikacija u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH	38
4.1.10. Povezanost viremije i genotipa u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH	38
4.2. HCMV infekcija u odraslih bolesnika sa hematološkim malignim bolestima – retrospektivna studija slučajeva i kontrola	40
4.2.1. Prokuženost HCMV u grupi bolesnika sa hematološkim malignim bolestima	40
4.2.2. Odnos HCMV infekcije između grupe bolesnika sa hematološkim malignim oboljenjem i kontrolne grupe	41
4.2.3. HCMV seropozitivnost kod bolesnika sa hematološkim malignim bolestima širom sveta	41
<b>5. Diskusija</b>	<b>44</b>
<b>6. Zaključci</b>	<b>60</b>
<b>7. Literatura</b>	<b>64</b>

# Uvod

---

## 1.1. Istorijat

---

Posmatrajući patohistološke preseke tkiva bubrega mrtvorođenog deteta sa kongenitalnim sifilisom, kao i preparate parotidnih žlezda dece, nemački naučnik i patolog Hugo Ribert (*Ribbert*) je prvi primetio 1881. godine ćelije karakteristične za infekciju humanim citomegalovirusom (HCMV) [1]. Jesionek (*Jesionek*) i Kiolemenoglu (*Kiolemenoglou*) su 1904. godine opisali slične ćelije u plućima, bubrezima i jetri osmomesečnog fetusa koji je bio inficiran uzročnikom sifilisa, opisavši ih kao strukture "slične protozoama" [2]. Ove ćelije su posedovale ekscentrično postavljeno jedro sa "centralnim nuklearnim telom" oko kog se prostirao providan halo (Slika 1).

Radeći u Ribertovoj laboratoriji, Levenštajn (*Löwenstein*) je opisao iste ćelije u parotidnim žlezdama dece [3]. Navedeni izveštaji predstavljaju prve opise karakterističnih citomegaličnih ćelija sa intranuklearnim inkuzijama.

Prve pretpostavke o virusnoj etiologiji pomenutih promena u ćelijama ovakvog histološkog profila daju Fon Glan (*Von Glahn*) i Papehajmer (*Pappenheimer*) u radu iz 1925. godine. Oni su primetili da je Lipšvec (*Lipschuetz*) otkrio ćelije sa intranuklearnim inkluzijama u lezijama osobe obolele od genitalnog herpesa i herpes zoster [4, 5]. Ovo ih je navelo na pretpostavku da su viđene promene posledica patogenog dejstva virusa, a ne protozoa.

Post-mortem patohistološkim pregledom pljuvačnih žlezda dece i Farber (*Farber*) i Volbah (*Wolbach*) su 1932. godine opisali prisustvo ćelija sa inkluzijama [6]. Ovakav nalaz je bio prisutan u preko 14% nekropsija, ukazujući na to da infekcija ovim patgenom nije retka.

Ćelije sa pomenutom karakterističnom histološkom prezentacijom su do 1932. godine uočene u 25 slučajeva retke kongenitalne infekcije koja se klinički odlikovala prisustvom petehija, hepatosplenomegalije i intracerebralnih kalcifikacija. Vajat (*Wyatt*) i saradnici su 1950. godine za ovaj klinički entitet predložili naziv "generalizovana citomegalična inkluziona bolest" (CIB) [7]. U ovom slučaju, intracelularne inkluzije su se dosledno mogle pronaći u ćelijama bubreržnih tubula. Ovo zapažanje je dovelo do pretpostavke da bi se bolest mogla dijagnostikovati i za života tražeći karakteristične ćelije u sedimentu urina. Virusna etiologija ove bolesti je i dalje bila neprepoznata.

Prateći ovu pretpostavku, Feterman (*Fetterman*) je napravio citološki preparat sedimenta urina osobe sa suspektom CIB, čime prvi uspešno postavlja dijagnozu ovog entiteta u živog bolesnika [8].

Prvi direktan pogled u svet HCMV nam omogućava elektronska mikroskopija. Koristeći ovu tehniku u radu objavljenom 1953. godine, Minder (*Minder*) opisuje prisusvo

čestica veličine 199 nanometara sugestivnih na virus u prozračnom halou oko inkluzija u ćelijama pankreasa kod bolesnika sa CIB [9].

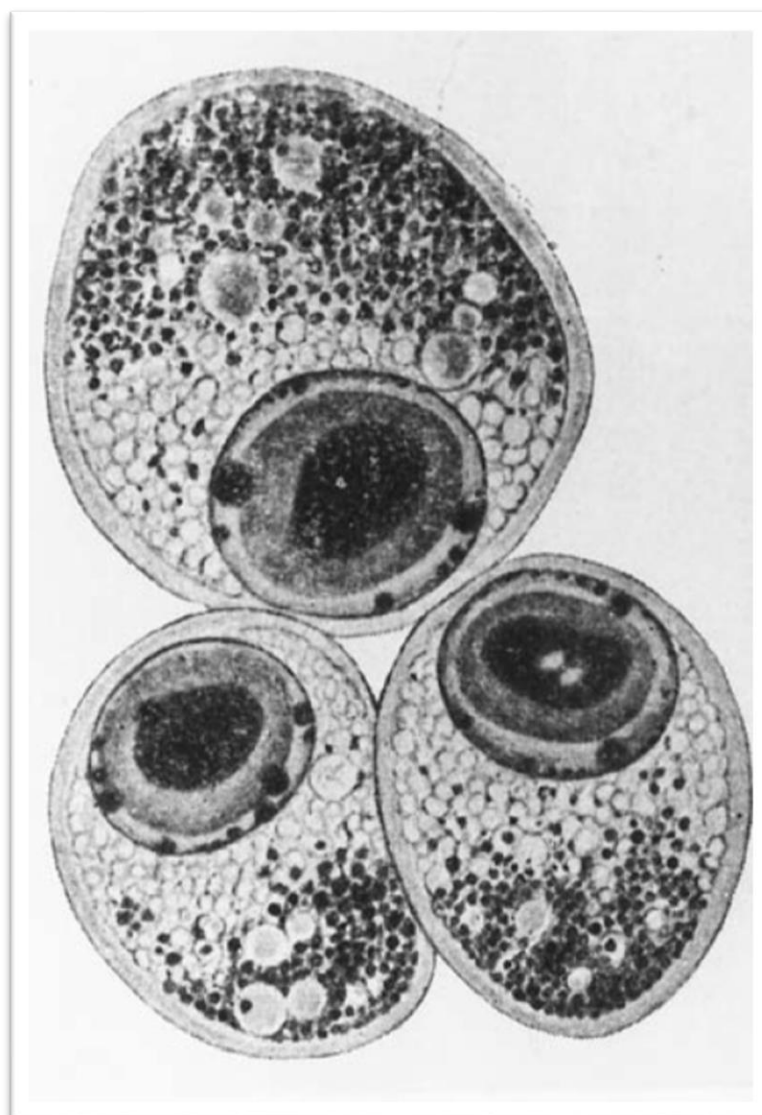
S obzirom na to da je u pitanju patogen koji isključivo inficira ljude, izolacija HCMV morala je da sačeka eru u kojoj bi humane ćelije mogle rutinski da se kultivišu. Prilika se konačno ukazala sa uspehom Endersa (*Enders*; Slika 2) i saradnika da izoluju poliovirus u humanim embrionalnim ćelijama, poduhvatom koji je krunisan Nobelovom nagradom 1954. godine [10]. Ovo prestižno priznanje Enders je podelio sa Frederikom Čepmanom Robinsom (*Robbins*) i Tomasom Haklom Velerom (*Weller*; Slika 3), koji će nešto kasnije igrati važnu ulogu u istoriji HCMV.

Margaret Smit (Slika 4) je 1955. godine izolovala virus iz pljuvačne žlezde koji se umnožavao samo u humanim, ali ne i ćelijskim kulturama miša. Danas znamo da je ovo posledica visoke specifičnosti različitih citomegalovirusa za životinjsku vrstu koju inficiraju. Smitova je nazvana i "majkom citomegalovirusa" [11].

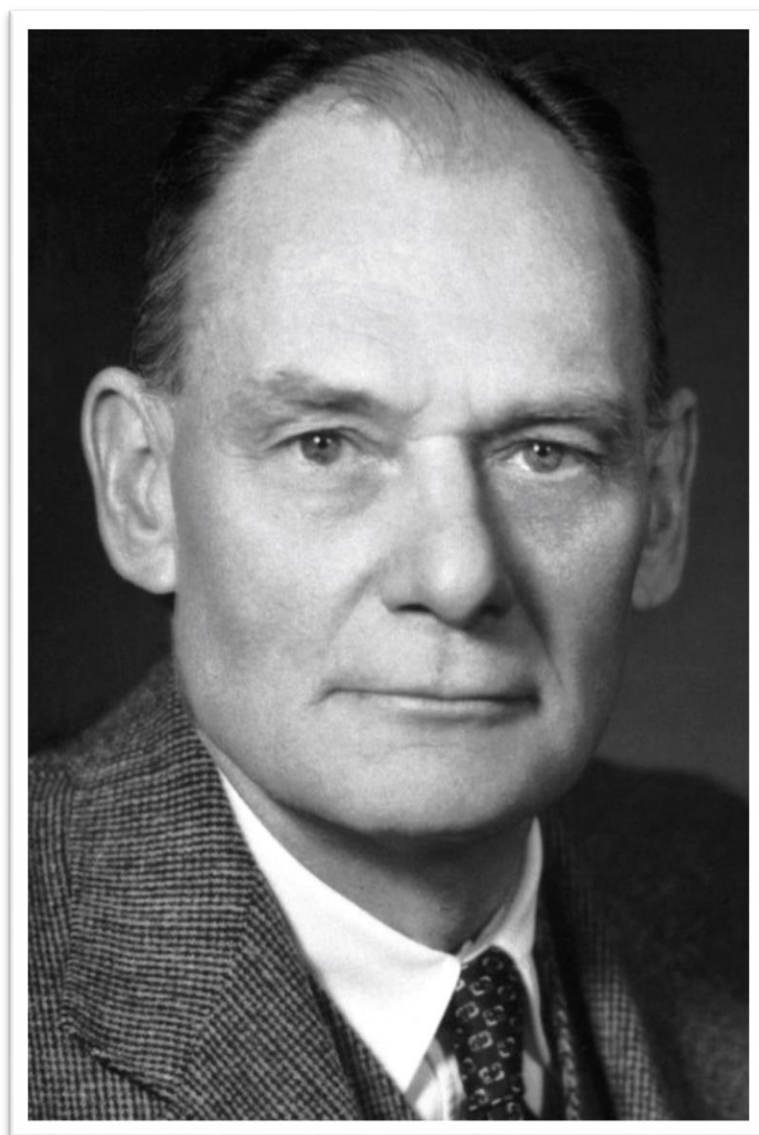
Koristeći ovu metodu izolacije, Veler, inače pedijatar i parazitolog, započinje kultivaciju protozoe *Toxoplasma gondii* u humanim embrionalnim ćelijama. Toksoplazma je patogen koji dovodi do ozbiljnog i ponekad smrtonosnog kongenitalnog oboljenja koje klinički veoma podseća na CIB. Upravo je iz uzorka pedijatrijskog bolesnika sa sumnjom na kongenitalnu toksoplazmozu 1957. godine izolovan virus koji je kasnije identifikovan kao HCMV [12].

Rou (*Rowe*) i saradnici [13] su izolovali virus iz adenoidnog tkiva za koji su pretpostavljali da se radi o izazivaču ovčjih boginja, s obzirom na prisustvo jedarnih inkluzija kakve je opisao Veler 1953. godine kod bolesnika sa varičelom [14]. Ispitivani material je radi provere bio odnet u Velerovu laboratoriju, koji je došao do zaključka da se zapravo radi o agensu koji je on sam izolovala nešto ranije iz uzorka bolesnika sa toksoplazmozom [12].

Naučnici koji su na ovaj način nezavisno izolovali viruse su razmenili uzorke sa agensima međusobno, a potom i potvrdili njihovu sličnost [15]. Veler je virusu dao ime - *citomegalovirus*.



**Slika 1.** Čelije sa jedarnim inkluzijama sa haloom za koje su *Jesionek* i *Kiolemenoglu* smatrali da predstavljaju parazite. Izvor: Ho M. *The history of cytomegalovirus and its diseases*.



**Slika 2.** Džon Frenklin Enders (februar 1897. – septembar 1985.).  
Izvor: [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)



**Slika 3.** Tomas Hakl Veler (jun 1915. – avgust 2008.).  
Izvor: [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org).



**Slika 4.** Margaret Gledis Smit (februar 1896. – maj 1970.).  
Izvor: [compass.fivecolleges.edu](http://compass.fivecolleges.edu).

## 1.2. Karakteristike HCMV

---

### 1.2.1. Klasifikacija

Herpesvirusi su patogeni koji inficiraju mnoge kičmenjake, a među njima ljude i druge primat. Smatra se da su herpesvirusi evoluirali u veoma bliskoj asocijaciji sa domaćinom kog inficiraju, što je naročito primetno u slučaju citomegalovirusa koji inficiraju primat.

Po klasifikaciji Međunarodnog komiteta za virusnu taksonomiju (International Committee on Taxonomy of Viruses, <https://talk.ictvonline.org/>), humani citomegalovirus, odnosno humani betaherpesvirus 5, spada u familiju *Herpesviridae*, subfamilija *Betaherpesvirinae*. U rodu *Cytomegalovirus*, HCMV deli mesto sa još 10 drugih virusa koji kao domaćine imaju različite primat (Slika 5).

### 1.2.2. Struktura viriona

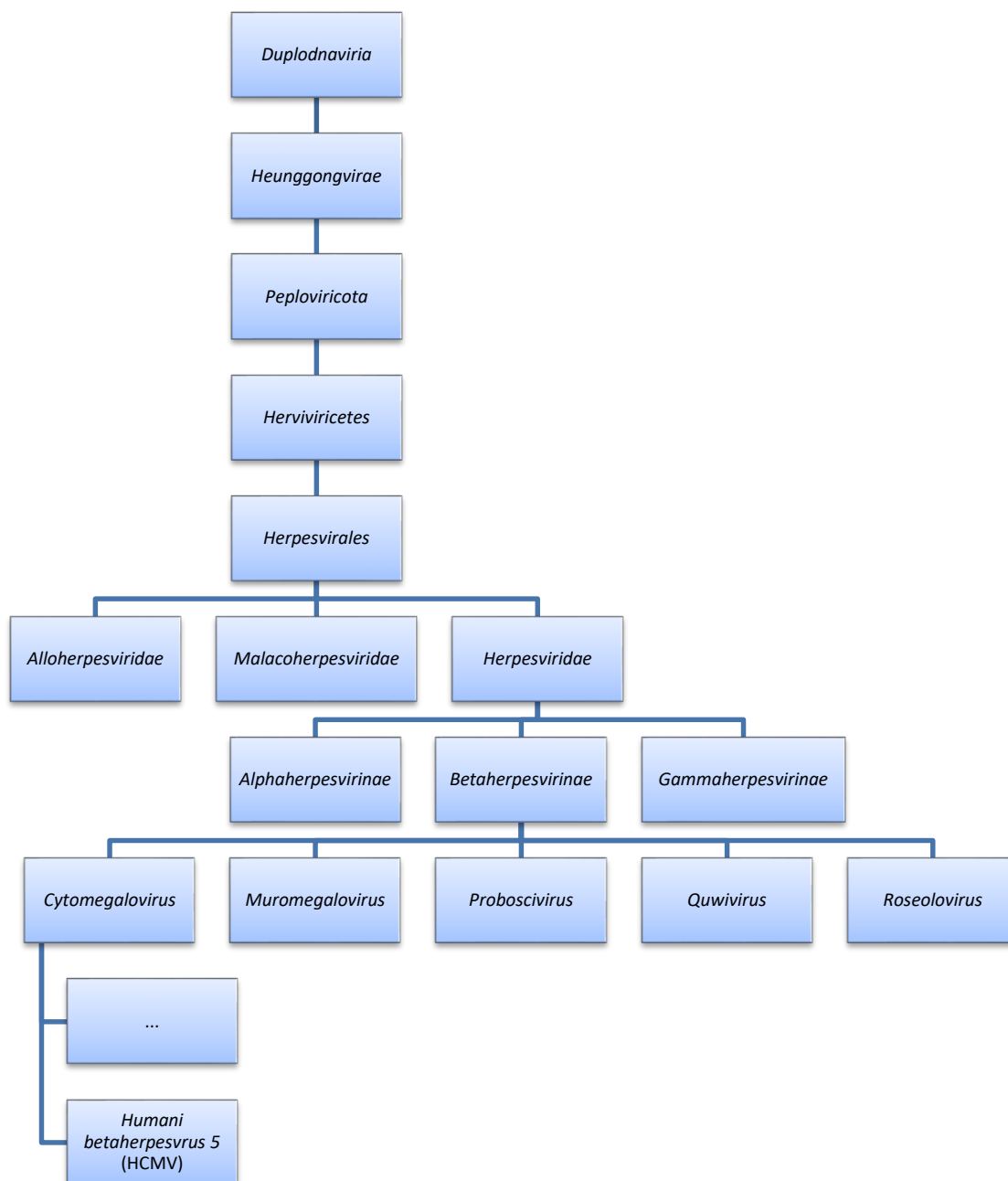
Humani citomegalovirus poseduje strukturu tipičnu za druge herpesviruse čoveka (Slika 6). Nasledni materijal HCMV čini dvolančana linearna DNK zaštićena ikozaedarnim kapsidom. Kapsid je veličine 130nm i sastoji se od 162 kapsomere – ovu formaciju sačinjava 150 heksamera (heksona) i 12 pentamera koji se nalaze na rogljevima (verteksima) samog ikozaedra (Slika 7) [16]. U toku replikacije, stvara se tri tipa kapsida (A, B i C), a samo tip C sadrži nukleinsku kiselinu i može da sazri u zrelu, infektivnu virusnu česticu [17].

Glavni kapsidni protein (engl. *major capsid protein*, MCP) formira kako heksone, tako i pentone, dok se najmanji kapsidni protein (engl. *smallest capsid protein*, SCP) nalazi na vrhu heksona. Manji kapsidni protein (engl. *minor capsid protein*, mCP) asociira sa mCP-vezujućim proteinom u odnosu 2:1 kako bi se formirali trostruki kompleksi koji povezuju kapsomere [18, 19]. Gen *UL104* kodira portalni protein, gradivnu komponentu portalnog kompleksa lociranog na jednom od verteksa. On predstavlja ulazno mesto za virusnu DNK u preformirani prokapsid [20].

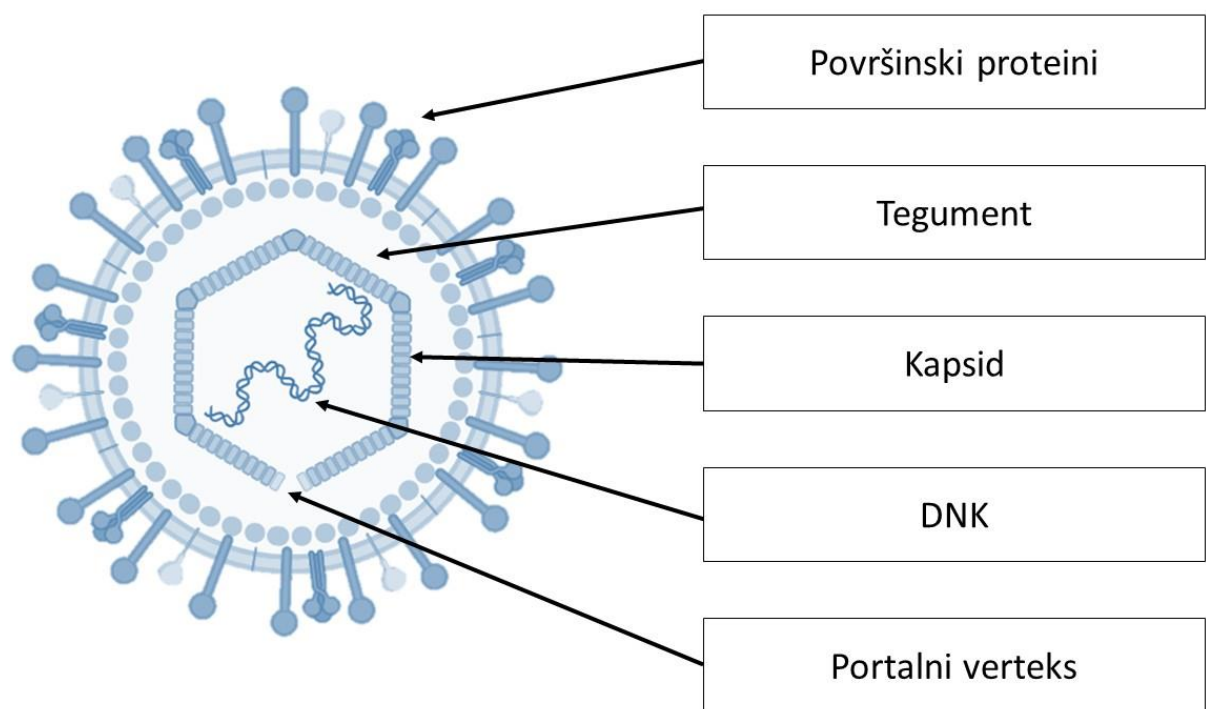
Nukleokapsid je okružen tegumentom, proteinskim slojem karakterističnim za porodicu *Herpesviridae*. Tegument se nalazi između kapsida i lipidnog omotača virusa i međusobno ih povezuje. Sastoji se od najmanje 27 proteina, od kojih su većina fosforilisani i visoko imunogeni [21]. Uloga ovog sloja nije isključivo u asocijaciji nukleokapsida i lipidne membrane – proteini tegumenta vrše spektar funkcija kao što su npr. transkripciona aktivacija, ulazak virusa u ćeliju, izbegavanje imunskog odgovora i progresija ćelijskog ciklusa [22, 23, 41].

Najpovršniju strukturu HCMV čini dvoslojna lipidna membrana ćelijskog porekla. Ova struktura je nešto više pleomorfna nego kod drugih herpesvirusa, što omogućava morfološko raspoznavanje HCMV [24]. Ona je prožeta brojnim virusnim glikoproteinima, kao što su glikoproteini B i N, koji imaju ključne uloge u virusnoj replikaciji.

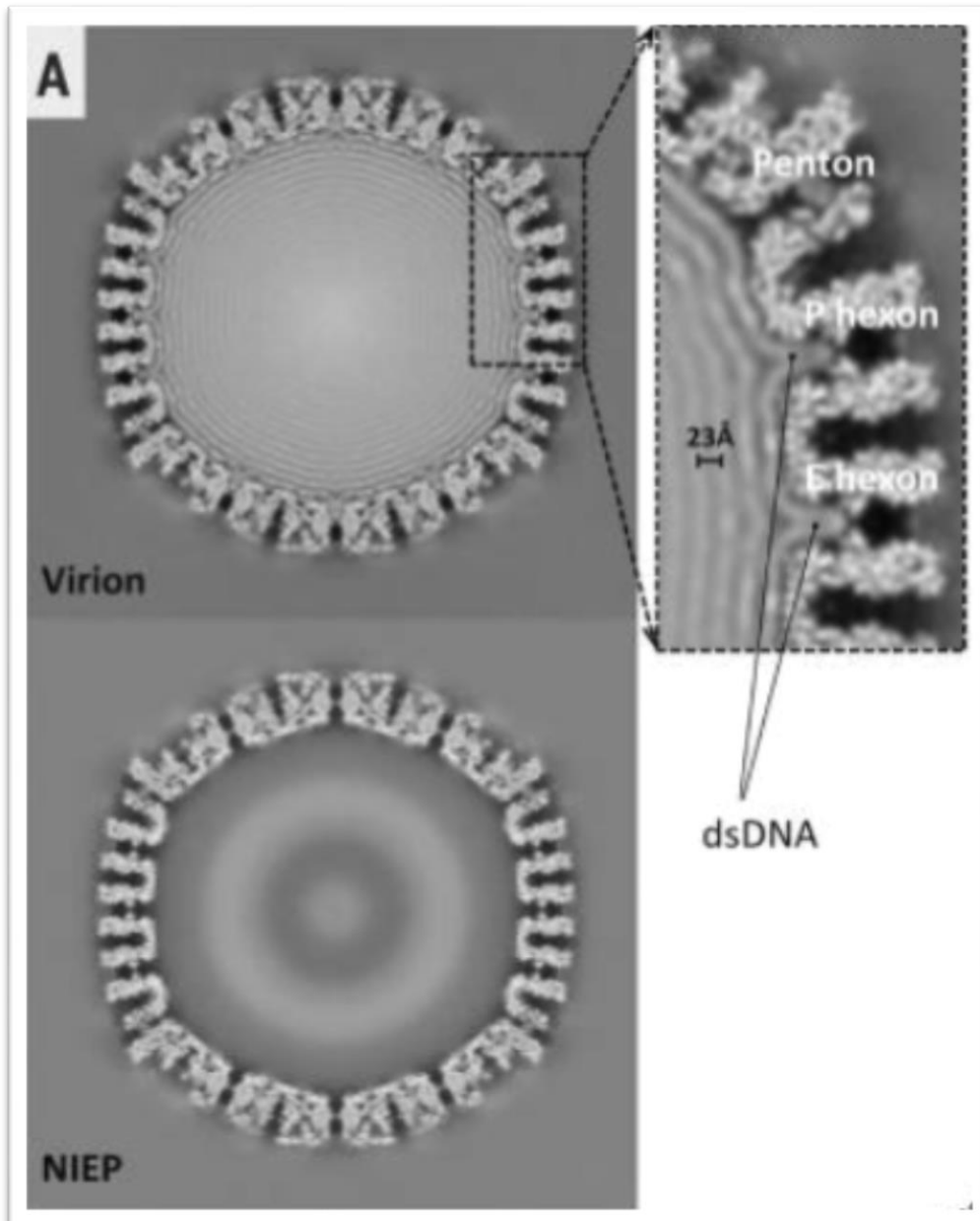




**Slika 5.** Klasifikacija humanog citomegalovirusa.  
 Izvor: International Comitee on Taxonomy of Viruses  
 (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>)



**Slika 6.** Shematizovana struktura humanog citomegalovirusa.



**Slika 7.** Krioelektronska mikroskopija čestice HCMV. Centralni preseki viriona (A, gore) i neinfektivne čestice (NIEP; A, dole).

Izvor: Xuekui Yu i sar., *Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150.*

### 1.2.3. Karakteristike i organizacija genoma

Humani citomegalovirus poseduje najduži genom od svih herpesvirusa čoveka (Slika 8). Dvolančana linearna DNK HCMV je dužine oko 236 000 baznih parova i sadrži više od 751 okvira čitanja [25, 26]. Od njih, 282 virusna transkripta je translaciono aktivno, od kojih 206 poseduju kodirajući potencijal [27], a jedna trećina poli-A RNK transkripta kodiraju proteine [28]. Iako je funkcija mnogih gena i dalje nepoznata, uloge i funkcije većine HCMV gena u infektivnim stadijumima su identifikovane.

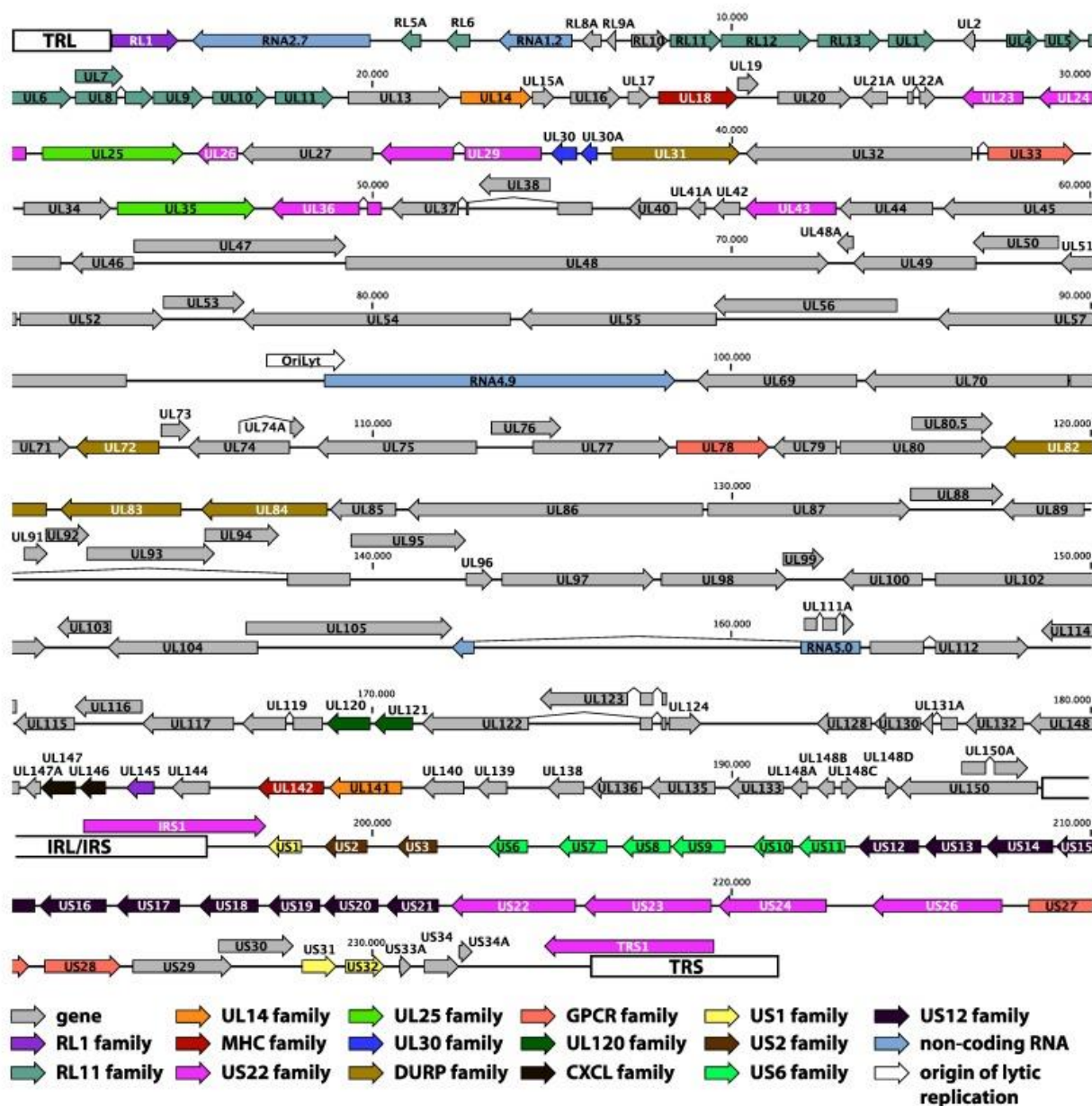
Prvi dokazi o postojanju različitih sojeva HCMV dolaze iz eksperimenta koji su sprovedli Veler i saradnici testirajući serum dva bolesnika sa CIB na izolatima virusa metodom fiksacije komplementa [29].

Genom HCMV je organizovan tako da sadrži jedinstveni dugi ( $U_L$ ) region i jedinstvene kratke regione ( $U_S$ ), na čijim krajevima se nalaze terminalni i unutrašnji ponovci. Različiti sojevi HCMV pokazuju homologiju DNK sekvence veću od 95%. Uprkos tolikoj sličnosti, pojedini regioni predstavljaju mesta visoke varijabilnosti. Najpromenljiviji geni su *UL73* (kodira glikoprotein N), *UL74* (kodira glikoprotein omotača O), *UL144* (kodira membranski glikoprotein pUL144) i *UL146* (kodira hemokin xCXCL1), čija varijabilnost može biti veoma korisna u praćenju virusne transmisije u bolničkom okruženju. Ovi polimorfni geni su korišćeni u ispitivanju moguće povezanosti genotipa sa određenom bolešću, ali i u određivanju geografske distribucije sojeva.

U produktivnoj infekciji, HCMV pokazuje svojevrsnu temporalnu kaskadu genske ekspresije tri grupe gena:  $\alpha$  *immediate early* (IE),  $\beta$  *early* (E, ili DE) i  $\gamma$  *late* (L) gena [31, 31]. Ove genske klase se ekspimiraju redom i koordinisano tokom 48 do 72 sata produktivnog replikativnog ciklusa. Transkripciona regulacija virusne i ćelijske genske ekspresije je posredovana IE genima (*IE1* i *IE2*) ili DE genima (*UL34*, *UL35*, *UL112-UL113* i *UL69*). Ekspresija DE gena je neophodna za sintezu virusne DNK i zavisi od funkcionalne ekspresije produkata IE gena. Na kraju, ekspresija L gena je zavisna od ekspresije DE gena. Ona obuhvata genske produkte koji formiraju virione i kontrolišu maturaciju. Organizacija genoma HCMV je prikazana na Slici 8.

Ćelijska RNK polimeraza II i asocirana transkripciona mašinerija kontrolišu virusnu transkripciju tokom čitave infekcije, iako u ovom procesu značajnu ulogu igraju i molekuli-transaktivatori porekla samog patogena. Skorašnja ispitivanja putem dubokog sekvenciranja virusnih genoma iz kliničkih uzoraka su otkrila impresivan nivo varijabilnosti, koji nagoveštava da je replikacija DNK genoma HCMV sklona greškama na nivou sličnom nekim RNK virusima [32].

Konačno, translacija je proces koji je u potpunosti zavisna od ćelijskih ribozoma.



Slika 8. Organizacija genoma HCMV.

Na slici je prikazan soj "Merlin", GenBank pristupni naziv NC\_006273. Dvolančana DNK je prikazana crnom linijom. Pozicije nukleotida su izražene u baznim parovima (bp). Terminalne i unutrašnje ponavljajuće sekvence (TRL, IRL/IRS i TRS) su prikazane belim pravougaonicima. Strelice predstavljaju gene; različite genske familije su obojene različitim bojama.

Izvor: Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. *Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing*.

### 1.2.3.1. HCMV geni UL55 i UL73

Pet glikoproteina lipidnog omotača (gB, gH:gL, gM:gN) su jedni od najvažnijih molekula uključenih u replikaciju i predstavljaju mete za neutrališuća antitela [33]. Glikoproteini B i gH:gL igraju ključnu ulogu u pripajanju i ulasku virusa u ćeliju, dok je gM:gN vezan za sazrevanje virusne čestice.

### **1.2.3.1.1. UL55 i glikoprotein B**

Glikoprotein B je kodiran od strane gena *UL55*. On formira trimer (gC1) na lipidnom omotaču i posreduje u spajanju membrana virusne čestice i ćelije i njenom ulasku u ćeliju domaćina. Ovaj molekul predstavlja ključno ciljno mesto za vezivanje neutrališućih antitela. Glikoprotein B učestvuje i u širenju virusa direktno između ćelija (engl. *cell-to-cell spread*), kao i u spajanju ćelija koje za ishod ima formiranje sincicijuma. U osnovi oba ova procesa jeste membranska fuzija.

Na osnovu varijacije u sekvenci *UL55* gena, identifikovano je četiri glavna gB genotipa (gB1, gB2, gB3 i gB4), kao i tri ne-prototipske varijante (gB5, gB6 i gB7) [34]. Pojedina istraživanja pokazuju da genetska varijacija između HCMV sojeva može biti povezana sa njihovom patogenošću [35, 36].

### **1.2.3.1.2. UL73 i glikoprotein N**

Kompleks gCII (gM:gN) je odgovoran za ulazak patogena u ćelije. Glikoprotein N koga kodira *UL73* je jedan od najvarijabilnijih genskih produkata [33]. Ovaj gen je jedan od mnoštva koji učestvuju u latenciji virusa. Glikoprotein N takođe predstavlja važnu metu imunskog sistema i indukuje stvaranje neutrališućih antitela. Do sada je identifikovano četiri genotipske varijante (gN1, gN2, gN3 i gN4). U okviru poslednje dve, postoje subgenotipovi – gN3a i gN3b, kao i N4a, gN4b i gN4c, respektivno. Varijanta označena kao gN4 je povezana sa povećanim rizikom za nastanak kongenitalne HCMV bolesti.

Brojna istraživanja su ispitivala povezanost između kliničkih manifestacija i glikoproteina B i N u odraslih imunokompromitovanih bolesnika [36-40]. Studije u dece i adolescenata su veoma retke.

## **1.2.4. Transmisija i patogeneza**

Slično ostalim herpesvirusima, nakon primarne infekcije HCMV ostaje prisutan u domaćinu tokom čitavog života.

Transmisija HCMV se najčešće odvija direktnim kontaktom. Infekcija ovim patogenom u ljudi započinje kada izlaganje domaćina virusu prevaziđe urođene imunske barijere, te započnu održiva replikacija i sistemsko širenje virusa.

Primarna infekcija najčešće počinje replikacijom u epitelu mukoza na mestu samog izlaganja patogenu. Sistemska faza primarne infekcije u odraslih je praćena najvišim nivoima sekrecije virusa u salivi, urinu, majčinom mleku i genitalnim sekretima. Ovo su verovatno najvažniji načini transmisije virusa među ljudima.

Leukociti periferne krvi su odgovorni za diseminaciju virusa do pljuvačnih žlezda i bubrega. U zavisnosti od starosti domaćina, lučenje virusa u salivi i urinu može trajati mesecima i godinama. Perzistentno i ponavljano lučenje u ovim ekskretima je češće u dece nego u odraslih. Nezavisno od načina dospevanja virusa u organizam, infekcija kulminira viremijom asociranom sa leukocitima. Posledica viremija je dopremanje patogena u one organe u kojima se on aktivno razmnožava i iz kojih se zrele HCMV čestice dalje mogu lučiti i inficirati drugog domaćina.

Humani citomegalovirus može da inficira epitelne ćelije, glatke mišićne ćelije, nervne ćelije, fibroblaste, ćelije mijeloidne loze (monociti/makrofagi i dendritske ćelije) i endotelne ćelije [33]. Prirodno mesto latencije HCMV se nalazi u hematopoetskim ćelijama porekla koštane srži.

U fibroblastima HCMV stvara veliki broj virusnih čestica kroz obimnu replikaciju i proliferaciju [41]. Monociti inficirani HCMV prenose patogen do različitih organa putem krvi, čime doprinose produktivnoj i perzistentnoj infekciji [42-46]. Posle indukcije, HCMV-inficirani monociti se mogu diferencirati u makrofage, te dalje održavaju replikaciju i ekspresiju virusnih gena [46].

Šema replikativnog ciklusa HCMV je prikazana na Slici 9. Virusna penetracija se odvija ili direktnom fuzijom sa ciljnom ćelijom (fibroblasti), ili endocitozom ukoliko su u pitanju drugi ćelijski tipovi (endotelne i epitelne ćelije) [33]. Nukleokapsid se putem mikrotubula doprema do kompleksa jedarnih pora, gde se genom virusa otpušta u jedro. Iz linearne forme, genom HCMV unutar jedra prelazi u kružni oblik. Sama DNK replikacija se takođe odvija u nukleusu na poseban način, takozvanom tehnikom kotrljajućeg obruča. Sastavljanje kapsida kao i DNK enkapsidacija se odvijaju takođe u jedru.

Prvu lipidnu ovojniciu virus dobija od unutrašnje jedarne membrane. Ubrzo nakon toga ona se spaja sa spoljašnjom jedarnom membranom. Glikoproteini koji će biti integrisani u lipidnu membranu zrele virusne čestice se stvaraju u endoplazmatskom retikulumu i glikozilišu u Goldžijevom telu. Drugi i ujedno konačni fosfolipidni dvosloj HCMV dobija od "endoplazmatski retikulum/Goldži intermedijernog kompartmana" (ERGIC-a) ili endozomalnih membrana, nakon čega virus napušta ćeliju egzocitozom.

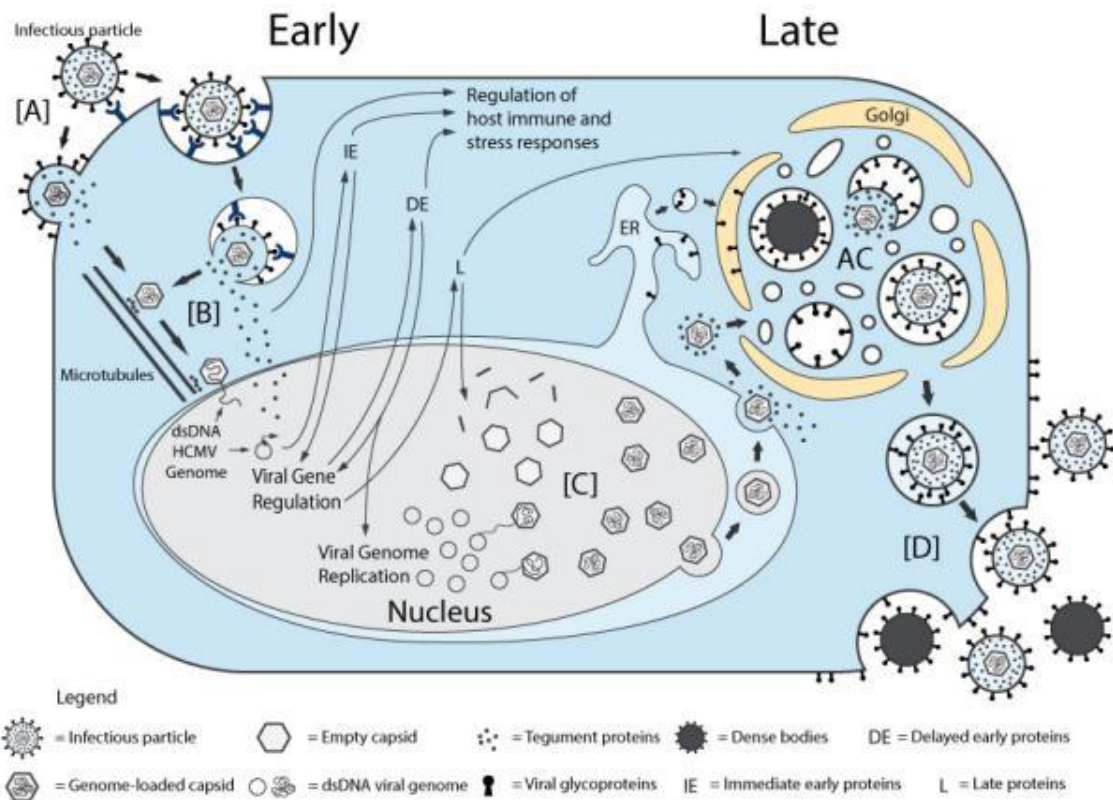
Humani citomegalovirus poseduje najkompleksniji od svih herpesvirusnih viriona [33]. Zrela infektivna čestica se sastoji od najmanje 66 proteina koji imaju različite uloge tokom infekcije. Mnogi od njih moduliraju i posreduju u ulasku i izlasku virusa iz ćelije, utiču na ćelijski tropizam i interaguju sa odgovorom na infekciju koji razvija domaćin.

Na osnovu vremena pojave citopatogenog efekta u ćelijskoj kulturi, HCMV se smatra sporo-replikujućim patogenom, a naročito kada se uporedi sa drugim članovima porodice *Herpesviridae*, kao što je na primer herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1) [47]. Iako je replikativni ciklus HCMV spor (potrebno je od 48 do 72 sata do dostizanja konačnih faza sazrevanja i oslobađanja zrelih virusnih čestica), ekspresija *IE* gena počinje unutar nekoliko minuta od infekcije. Promena od rane u kasnu fazu je znatno duža, od 24 do 36 sati posle infekcije, a može trajati i duže u zavisnosti od tipa ćelije koji je inficiran.

Humani citomegalovirus može ući u latentnu fazu. Latencija je stanje u kom je u ćeliji prisutna virusna DNK, ali ne dolazi do stvaranja infektivnih virusnih čestica.

Detekcija mnogih virusnih transkripta u zdravih seropozitivnih osoba može predstavljati reaktivaciju latentnog virusa i transkripciju virusnih gena u novoinficiranim ćelijama.

Virus se može preneti sa majke na plod putem placente i majčinim mlekom. Transmisija urinom i salivom je takođe moguća, a HCMV se može detektovati i u cervikalnim i seminalnim sekretima. Konačno, transplantacija organa (a samim time i transfuzija krvi) predstavlja put prenošenja ovog patogena.



**Slika 9.** Pregled replikativnog ciklusa HCMV.

(A) Infektivne čestice ulaze u ćeliju putem interakcije sa ćelijskim receptorima. Kapsid i proteini tegumenta su isporučeni u citosol. (B) Kapsid se prenosi do jedra, unutar kog genom virusa cirkularizuje. Proteini tegumenta regulišu odgovore ćelije domaćina i započinju temporalnu kaskadu ekspresije virusnih IE gena, a zatim DE gena (koji započinju replikaciju virusnog genoma) i L gena. (C) Ekspresija kasnih gena inicira sastavljanje kapsida u jedru. Kapsidi asociiraju sa proteinima tegumenta u citosolu i bivaju preneseni do kompleksa za sklapanje virusa (AC) koji sadrži komponente endoplazmatskog retikuluma (ER), Goldžijevog aparata i endozomne mašinerije. (D) Infektivne čestice sa omotačem se oslobađaju zajedno sa neinfektivnim gustim telima.

Izvor: Jean Beltran PM, Cristea IM. *The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics.*

### 1.2.5. Imunski odgovor domaćina

Ćelijski imunitet je taj koji uspešno ograničava primarnu HCMV infekciju [33]. Po njenom okončanju, u koštanoj srži virus perzistira latentno inficirajući ćelije mijeloidne loze kao što su prekursori monocita, makrofaga i dendritske ćelije. Ove latentno inficirane ćelije predstavljaju izvor virusa odakle se on širi celim organizmom, ali i doprinose riziku za prenos HCMV putem transplantacije organa ili transfuzije krvi.

Imunski sistem nije u mogućnosti da u potpunosti odstrani HCMV iz organizma. Snažni imunski modulatori porekla samog patogena verovatno pomažu HCMV da ublaži snagu imunskog nadzora, a uz to i olakšavaju perzistenciju infekcije. Adaptivni T-ćelijski odgovor dominantno je taj koji količinu virusa održava na niskom nivou. Ovaj imunski arsenal, koji je slabije razvijen u dece, tek posle dužeg vremena uspešno uspeva da kontroliše aktivnu HCMV replikaciju. Adaptivni T-ćelijski odgovor najverovatnije doprinosi kontroli virusne latencije kroz supresiju reaktivacije ili, što je verovatnije,



prevencijom virusne amplifikacije nakon reaktivacije. Deficit T-ćelijskog odgovora koji se susreće u osoba sa sindromom stečene imunske deficijencije (AIDS), bolesnika kod kojih je urađena alogena transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze, solidnog organa ili tokom primene terapijskih protokola koji snažno suprimiraju ovaj imunski odgovor u osoba sa limfomim, širom otvara vrata za nastanak infekcije i bolesti.

### **1.2.6. Epidemiologija**

Humani citomegalovirus je ubikvitaran patogen. Rizik za infekciju je kontinuiran i doživotan [48], pri čemu se primarni kontakt najčešće dešava u toku prvih dvadeset godina života [49].

Više od polovine odraslih osoba starijih od 40 godina su inficirane HCMV [50], dok se prokuženost ovim patogenom kreće i do 100% u nekim delovima sveta gde se izloženost virusu dešava još u ranom detinjstvu [36]. Virus se prenosi bliskim, direktnim kontaktom sa telesnim tečnostima, kao što su urin, saliva, krv, suze, majčino mleko i genitalni sekreti [33]. Transmisija je najčešća u detinjstvu.

Ukupna prevalencija infekcije pokazuje veliku varijabilnost u zavisnosti od brojnih okolnosti. Mnoštvo faktora doprinosi HCMV seropozitivnosti/prokuženosti, kao što su starost [48, 51, 52], pol [48, 53, 54], socioekonomski status (bez obzira na starost, HCMV prevalenca je viša u osoba koje pripadaju nižim socio-ekonomskim grupama) [55-57], aktuelno pušenje [56], nivo obrazovanja [56], broj seksualnih partnera [56], praksa vezana za negu dece [51], različiti kulturalni uslovi ili običaji vezani za dojenje [51] i tako dalje.

Najskorije podatke o HCMV seroprevalenciji širom sveta daju Zuhair i saradnici, koji procenjuju globalnu seroprevalenciju na 83% u opštoj populaciji, 86% u žena u reproduktivnom dobu, kao i 86% u davalaca krvi ili solidnih organa [58]. Topografski, za svaku od pomenute tri grupe, najvišu seroprevalenciju od 90% pokazuje region Istočnog Mediterana (regionalna podela po Svetskoj Zdravstvenoj Organizaciji, SZO), a najmanju SZO Evropski region (66%) [58]. Infekcija izazvana HCMV je takođe najčešća intrauterina infekcija i predstavlja visok prioritet za razvijanje vakcine [59, 60].

### **1.2.7. Spektar oboljenja**

Osobe koje nikada nisu bile inficirane HCMV (seronegativni) razvijaju primarnu infekciju, dok oni koji su prethodno bili u kontaktu sa virusom (seropozitivni) mogu biti inficirani drugim sojem istog patogena [61]. U osoba koje su već jednom bile izložene virusu, reaktivacija HCMV takođe može dovesti do manifestne bolesti.

Infekcija HCMV uglavnom ne dovodi do pojave kliničkih manifestacija tokom primarne infekcije, reinfekcije ili reaktivacije jer su sva tri tipa infekcije pod efikasnom kontrolom normalnog imunskog sistema. Infekcija je, tako, u opštoj populaciji asimptomatska ili se može manifestovati u vidu febrilne bolesti ili sindroma sličnog mononukleozi. Sistemska bolest sa posledicama po specifične organe je u ovoj populaciji retka.

Humani citomegalovirus je najznačajniji infektivni uzročnik kongenitalne bolesti [55]. Procenat transplacentalnog prenosa je 33% u seronegativnih trudnica, dok je ovaj rizik značajno niži u žena sa rekurentnom infekcijom i kreće se oko 1% [33]. U slučajevima gde dolazi do oboljevanja ploda, sensorineuralna oštećenja (gubitak sluha, oštećenje vida i poteškoće u učenju) se javljaju kod 12-25% inficirane novorođenčadi [62]. Kod kongenitalno

obolele novorođenčadi u malom procentu slučajeva infekcija se manifestuje u vidu teške sistemske, po život ugrožavajuće citomegalovirusne inkluzione bolesti (CIB).

Za razliku od zdrave populacije, HCMV je važan izazivač teških oboljenja u osoba čiji je imunski sistem nezreo ili kompromitovan, kao što je plod *in utero* ili osobe sa malignim bolestima [58]; novorođenčad, primaoci transplantiranih tkiva i ćelija ili bolesnici inficirani HIV-om predstavljaju idealne domaćine za ostvarenje punog patogenog potencijala virusa [63]. Kliničke manifestacije imunosuprimiranih bolesnika sa HCMV infekcijom su prikazane u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Kliničke manifestacije u imunosuprimiranih bolesnika sa HCMV infekcijom.

<b>Transplantacija solidnog organa</b>	HCMV sindrom (akutna sistemska febrilna bolest), pneumonija, hepatitis, retinitis, pankreatitis, miokarditis, encefalitis, odbacivanje kalema, ubrzana vaskulopatija koronarnih arterija (transplantacija srca), povećan rizik oportunističkih bakterijskih i gljivičnih infekcija
<b>Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze</b>	Pneumonija, gastrointestinalna bolest, hepatitis encefalitis, retinitis, HCMV bolest kasnog početka (engl. <i>late onset disease</i> ), oportunističke bakterijske i virusne infekcije
<b>HIV/AIDS</b>	Retinitis, ezofagitis, kolitis, encefalitis, pneumonija, hepatitis, gastritis, periferna neuropatija, poliradikuloneuritis, veća učestalost kongenitalne HCMV bolesti (2.3-4.6% naspram 0.7% u opštoj populaciji), HCMV kao kofaktor u razvoju AIDS-a (?)

Pored direktnih efekata koji se mogu dokumentovati histopatološki u biopstatima organa, HCMV je povezan i sa indirektnim manifestacijama bolesti, koje postaju očigledne na nivou populacije, pre nego u pojedinca. Ovaj fenomen je prvi put opisan posle transplantacije solidnog organa, gde je značajno prisustvo ateroskleroze, odbacivanja kalema, i sekundarne bakterijske i gljivične infekcije primećeno u osoba sa istorijom HCMV viremije [64]. Indirektni efekti HCMV su prikazani u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Kliničke manifestacije HCMV infekcije u imunokompromitovanih bolesnika – indirektni efekti.

Imunosupresivno stanje	SOT*	TMČH#	HIV/AIDS
<b>Indirektni efekti</b>	Oštećena funkcija kalema Ubrzana koronarna stenoza (SOT srca) Oportunističke bakterijske i gljivične infekcije (...)	Oportunističke bakterijske i gljivične infekcije Povećan mortalitet (?)	Progresija u AIDS (?)

\* SOT – transplantacija solidnog organa; # TMČH – transplantacija matičnih ćelija hematopoeze.

Iako se HCMV ne smatra onkogenim virusom, infekcija ovim patogenom je dovedena u vezu sa različitim malignim bolestima [65]. Imajući u vidu povezanost mijeloidne loze sa HCMV, postavlja se pitanje o ulozi ovog virusa u hematološkim malignim oboljenjima. Infekcija HCMV *in utero* je predložena kao faktor rizika za razvoj akutne limfoblastne leukemije [66], najčešće maligne bolesti dečjeg doba. Veća incidencija hematoloških malignih oboljenja je primećena i u dece čije su majke imale HCMV infekciju na porođaju [67]. Nasuprot ovim dokazima, postoje istraživanja koja tvrde da HCMV pokazuje i supresivna dejstva na tumore [68]. Uloga ovog virusa kao eventualnog etiološkog agensa u patogenezi malignih bolesti krvi još uvek nije u potpunosti objašnjena.

Kriterijumi koji se uglavnom koriste kako bi se dokazala povezanost virusa i tumora su epidemiološke, serološke i molekularne prirode, kao i tumorski potencijal virusa u animalnim modelima ili pak ćelijskim kulturama. Takođe, virus može modifikovati fenotip već postojećeg tumora i/ili uticati na progresiju anaplastičnog procesa umesto da inicira onkogenezu. U slučaju malignih bolesti B-ćelijskog porekla, uloga HCMV još uvek čeka svoje razjašnjenje. Do sada nije zabeležena nijedna studija koja se bavi ispitivanjem moguće onkogenosti HCMV kod odraslih bolesnika sa B-ćelijskim malignim oboljenjima.

# *Ciljevi istraživanja*

---

1. Ispitati povezanost HCMV infekcije sa demografskim, virusološkim i kliničkim parametrima kod pedijatrijskih bolesnika posle alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze;
2. Utvrditi distribuciju HCMV gB i gN genotipova kod pedijatrijskih bolesnika posle alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze;
3. Ispitati povezanost gB i gN genotipova sa kliničkim manifestacijama i ishodima lečenja kod pedijatrijskih bolesnika posle alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze;
4. Ispitati povezanost HCMV i B-ćelijskih neoplazija upoređivanjem HCMV seroprevalencije između grupe adultnih bolesnika sa hematološkim malignim bolestima i kontrolne grupe osoba bez dijagnoze hematološkog malignog oboljenja, kao i dostupnih podataka iz literature.

# Materijali i metode

---

Istraživanje predviđeno doktorskom tezom je sprovedeno u sledećim ustanovama u periodu od 2017. do 2020. godine:

- Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu;
- Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, Odeljenje za trasplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju;
- Klinika za hematologiju Kliničkog centra Srbije i
- Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“.

Istraživanje je obuhvatilo dva tipa studije: prospektivnu studiju i studiju slučajeva i kontrola.

## 3.1. Ispitanici

---

### 3.1.1. Ispitanici – prospektivna studija kohorte pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena autologna i alogena TMČH

Za prospektivnu studiju, grupu ispitanika činilo je 42 pedijatrijska bolesnika koji su lečeni u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ na Odeljenju za trasplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju. Svim bolesnicima je dijagnostikovano maligno hematološko ili nemaligno oboljenje. Indikacije za TMČH su postavljene u skladu sa preporukama Evropskog društva za trasplantaciju krvi i kostne srži (engl.: *European Society for Blood and Marrow Transplantation, EBMT*) [69].

Klinički podaci su dobijeni iz odgovarajuće medicinske dokumentacije.

Od ukupno 42 bolesnika, 23 (54,76%) su bili muškog, a 19 (45,23%) ženskog pola.

Prosečan uzrast svih bolesnika je bio 8,9 godina (raspon 2-21 godina), dok je prosečan uzrast po polovima bio 9,7 godina za dečake (raspon 2-21 godina) i 7,8 godina za devojčice (raspon 2-17 godina).

Kod svih bolesnika je urađena TMČH, pri čemu je u 33 (78,57%) ispitanika urađena alogena, a u 9 (21,42%) autologna TMČH.

U zavisnosti od porekla matičnih ćelija hematopoeze, deca kod kojih je urađena TMČH su primila kalem od srodnog delimično podudarnog davaoca (HID; 9 bolesnika, 27,27%), identičnog srodnog davaoca (MSD; 12 bolesnika, 36,36%) i nesrodnog podudarnog davaoca (MUD; 11 bolesnika, 33,33%). Kod jednog bolesnika (3,03%), urađena je TMČH iz pupčane vrpce. Oblici trasplantacije, zajedno sa osnovnim bolestima ispitanika su predstavljeni u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Kliničke dijagnoze i oblici transplantacije matičnih ćelija hematopoeze.

Dijagnoze	Broj bolesnika (n, %)	Autologna TMČH	Alogena TMČH			
			HID	MUD	MSD	Pupčana vrpca
Akutna limfoblastna leukemija	13 (31%)	0	1	6	6	0
Akutna mijeloidna leukemija	6 (14%)	0	1	3	2	0
Neuroblastom	5 (12%)	5	0	0	0	0
Nehoćkinski limfom	4 (9,5%)	1	1	0	2	0
Hoćkinova bolest	3 (7%)	3	0	0	0	0
Mijelodisplastićni sindrom	2 (4,7%)	0	2	0	0	0
Hemofagocitna limfocitocitoza	2 (4,7%)	0	2	0	0	0
Teška kombinovana imunodeficijencija	2 (4,7%)	0	2	0	0	0
HGB	1 (2,4%)	0	0	1	0	0
Aplastićna anemija	1 (2,4%)	0	0	1	0	0
Mukopolisaharidoza tip 1	1 (2,4%)	0	0	0	0	1
Talasemija major	1 (2,4%)	0	0	0	1	0
JMML	1 (2,4%)	0	0	0	1	0
Ukupno	42 (100%)	21,5 (%)	78,5 (%)			

HID - srodni delimićno podudarni davalac; MUD - nesrodni podudarni davalac; MSD - identićni srodni davalac; JMML - juvenilna mijelomonocitna leukemija; HGB - hronićna granulomatozna bolest.

Kortikosteroidna terapija je primenjivana u 20 bolesnika (47,61%), dok 7 (16,67%) bolesnika nije dobijalo kortikosteroide. Za 15 ispitanika (35,71%) ova informacija nije bila dostupna.

Antivirusna terapija je administrirana kod 20 bolesnika (47,61%). Jedanaest bolesnika (26,19%) nije dobijalo antivirusnu terapiju, pri ćemu za 11 ispitanika (26,19%) nije dobijen ovaj podatak. Od lekova su primenjivani aciklovir, ganciklovir i valganciklovir. Specifićna anti-HCMV terapija je primenjivana kada bi u uzorku periferne venske krvi bilo dokazano više od 1000 kopija HCMV DNK po mililitru krvi. Kod jednog bolesnika su administrirani intravenski imunoglobulini zbog dokazane infekcije Epštajn-Bar virusom (EBV).

Minimalno vreme boravka u odeljenju je bilo mesec dana, a nakon toga je praćenje bolesnika nastavljeno preko dnevne bolnice. Cilj praćenja je bio blagovremena dijagnoza ranih i kasnih komplikacija TMČH i primena adekvatne terapije.

Kod dece je praćen potencijalni nastanak medicinskih komplikacija. Oboljenja koja su dijagnostikovana tokom lečenja su bolest kalema-protiv-domaćina (engl. *graft-vs-host disease*, GvHD), pneumonija, sepsa, mukozitis, hepatična veno-okluzivna bolest (VOD), retinitis, febrilna neutropenija i hemoragijski cistitis.

Osnovni podaci o bolesnicima, zajedno sa komplikacijama i drugim podacima su predstavljani u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Karakteristike pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena autologna ili alogena TMČH u odnosu na prisustvo HCMV infekcije.

Karakteristike kohorte bolesnika	CMV DNK pozitivni	CMV DNK negativni	p-vrednost
<i>Bolesnici (N, %)</i>	24 (57,1%)	18 (42,9%)	N/A
<i>Prosečan uzrast, raspon (godine)</i>	6 (2-21)	9,75 (2.5-17)	>0,05
<i>Pol</i>			>0,05
Muški	13 (56,5%)	10 (43,5%)	
Ženski	11 (57,9%)	8 (42,1%)	
<i>Oblik transplantacije</i>			<0,05
Alogena TMČH	24 (72,7%)	9 (27,3%)	
Autologna TMČH	0	9 (100%)	
<i>Osnovna bolest</i>			>0,05
Maligna	19 (52,8%)	17 (42,2%)	
Nemaligna	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
<i>Komplikacije</i>			
GVHD	20 (74%)	7 (26%)	<b>0,001</b>
Mukozitis	21 (55,2%)	17 (44,8%)	>0,05
Febrilna neutropenija	21 (55,2%)	17 (44,8%)	>0,05
Sepsa	3 (100%)	0	>0,05
VOD	3 (50%)	3 (50%)	>0,05
Pneumonija	1 (50%)	1 (50%)	>0,05
Hemoragijski cistitis	1 (100%)	0	>0,05
Retinitis	0	1 (100%)	>0,05
<i>Ishodi bolesti</i>			>0,05
Preživeli	15 (62,5%)	9 (37,5%)	
Umrli	8 (66,7%)	4 (33,3%)	

### **3.1.2. Ispitanici – prospektivna studija kohorte pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH**

Za prospektivnu studiju kod dece kod koje je urađena alogena TMČH, grupu ispitanika činilo je 32 bolesnika sa malignim hematološkim ili nemalignim oboljenjem koji su lečeni u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, u Odeljenju za trasplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju. Indikacije za TMČH su postavljene shodno preporukama EBMT.

Klinički podaci su dobijeni iz medicinske dokumentacije.

Osamnaest bolesnika (56,25%) su bili muškog, a 14 (43,75%) ženskog pola i prosečnog uzrasta 8,57 godina (raspon 2-21 godina).

Kod svih bolesnika je urađena alogena TMČH, pri čemu su kalemi bili porekla HID (9 bolesnika, 28,1%), MSD (12 bolesnika, 37,5%) i MUD (10 bolesnika, 31,3%). Kod jednog bolesnika (4,3%) je urađena TMČH iz nesrodne krvi pupčanika.

Režim kondicioniranja, davanje matičnih ćelija hematopoeze i praćenje u post-transplantacionom periodu je sprovedeno u Odeljenju za trasplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju. Kod svih bolesnika je primenjen odgovarajući režim kondicioniranja, u zavisnosti od osnovne bolesti, a prema preporukama EBMT ili prema odgovarajućim stručnim organizacijama.

Profilaktička primena aciklovira je bila obavezna za sve bolesnike. Terapijske doze aciklovira bi bile administrirane isključivo ukoliko je u uzorcima krvi dokazana infekcija herpes simpleks virusom (HSV), što je potvrđeno u 8 (25%) bolesnika. Ganciklovir ili valganciklovir su primenjeni terapijski u 13 (40,6%) ispitanika kod kojih je prisustvo HCMV dokazano *Real-Time* PCR-om.

Osnovni, demografski podaci o bolesnicima, zajedno sa dijagnozama i obliku TMČH su predstavljeni u Tabeli 5.



**Tabela 5.** Kliničke karakteristike kohorte pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH.

Karakteristike kohorte bolesnika		CMV DNK pozitivni	CMV DNK negativni	<i>p</i> -vrednost
Broj bolesnika (N, %)	32	23 (71,9%)	9 (28,1%)	N/A
Prosečan uzrast, raspon (godine) <sup>b</sup>	8,57, 2-21	8,93	7,66	<i>p</i> >0,05
Pol <sup>a</sup>				<i>p</i> >0,05
Muški	18	13 (72,2%)	5 (27,8%)	
Ženski	14	10 (71,4%)	4 (28,6%)	
Dijagnoze <sup>a</sup>				<i>p</i> >0,05
Maligna oboljenja				
Akutna limfoblastna leukemija	12 (37,5%)	6 (50%)	6 (50%)	
Nehoćkinski limfom	3 (9,37%)	3 (100%)	0	
Akutna mijelogeni leukemija	6 (18,75%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
JMML	1 (3,12%)	0	1 (100%)	
Mijelodisplastični sindrom	2 (6,25%)	2 (100%)	0	
Nemaligna oboljenja				
Talasemija major	1 (3,12%)	0	1 (100%)	
Hronična granulomatozna bolest	1 (3,12%)	1 (100%)	0	
Aplastična anemija	1 (3,12%)	1 (100%)	0	
SCID	2 (6,25%)	2 (100%)	0	
Hemofagocitna limfocitocitoza	2 (6,25%)	2 (100%)	0	
Mukopolisaharidoza	1 (3,12%)	1 (100%)	0	
Oblik alogene TMČH <sup>a</sup>				
MSD	12 (37,5%)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	<i>p</i> =0,006*
MUD	10 (31,3%)	8 (80%)	2 (20%)	<i>p</i> >0,05
HID	9 (28,1%)	9 (100%)	0	<i>p</i> =0,015*
Pupčana vrpca	1 (3,12%)	1 (100%)	0	<i>p</i> >0,05
Antivirusna terapija				N/A
Aciklovir (profićaktićka doza)	32 (100%)	23 (71,9%)	9 (28,1%)	
Aciklovir (terapijska doza)	8 (25%)	4 (50%)	4 (50%)	
Ganciklovir/Valganciklovir	13 (40,6%)	13 (100%)	0	
Oba leka	3 (9,37%)	3 (100%)	0	
GvHD <sup>a</sup>				<i>p</i> >0,05
Da	27 (84,4%)	20 (74,1%)	7 (25,9%)	
Ne	2 (6,25%)	1 (50%)	1 (50%)	

N/A, nije primenljivo; JMML, juvenilna mijelomonocitna leukemija; SCID, teško kombinovano smanjenje imuniteta; MSD, identični srodni davalac; MUD, nesrodni podudarni davalac; HID, srodni delimićno podudarni davalac; GvHD, bolest kalema-protiv-domaćina.

<sup>a</sup> Kategorićne varijable su testirane Hi-kvadrat testom.

<sup>b</sup> Skalarni i nominalni podaci su poređeni Wilcoxon-Mann-Whitney testom.

\* Statistićka znaćajnost je predstavljena asteriskom.

### 3.1.3. Ispitanici – retrospektivna studija slučajeva i kontrola

#### 3.1.3.1. Kohorta bolesnika – grupa slučajeva

Grupu bolesnika činilo je 83 odrasla bolesnika lečenih na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije sa potvrđenom dijagnozom hematološke maligne bolesti. Profil ispitivanih malignih bolesti krvi je bio ograničen na B-ćelijske limfoproliferativne diskrazije.

Potrebni klinički podaci su dobijeni iz odgovarajuće medicinske dokumentacije.

Četrdeset i tri (51,8%) bolesnika bili su muškog, a 40 (48,19%) ženskog pola.

Prosek godina kohorte je bio 49,45 godina. Muškarci su bili prosečne starosti 52,3 godine (raspon 20-73 godine) a žene 48,1 godine (raspon 21-73 godine).

Spisak osnovnih oboljenja za ovu grupu bolesnika je prikazan u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Hematološka oboljenja zastupljena u grupi adultnih bolesnika.

Oboljenja
Nehočkinski limfom
Hočkinova bolest
B hronična limfocitna leukemija
Valdenstremova makroglobulinemija
B-ćelijski limfom, NOS
Plazma-ćelijski mijelom
Leukemija vlasastih ćelija
B-ćelijska akutna limfoblastna leukemija

Uzorak za virusološke analize je kod 41 (49,4%) bolesnika uzet po započinjanju ili tokom hemioterapije, dok 42 (50,6%) ispitanika nisu bili na terapijskom režimu u toku uzimanja uzorka. Primenjeni protokoli za lečenje bolesnika sa limfoproliferativnim bolestima su prikazani u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Hemioterapijski režimi u grupi adultnih bolesnika.

Hemioterapijski režim*	Bolesnici (n=83)
ABVD	4
BEAM	1
CHOP	4
COP	1
DHAP	10
R-DHAP	1
Endoxan	1
ESHAP	1
PAD	1
R-EPOCH	1
R-CHOP	8
HyperCVAD	8
Nelečeni	42

\* Skraćenice: ABVD - Doksorubicin hidrohlorid (Adriamycin), Bleomicin sulfat, Vinblastin sulfat i Dakarbazin; BEAM - Karmustin (BiCNU), Etopozid, Citarabin (Ara-C, cytozin arabinozide), Melfalan; R-CHOP - Rituximab, Ciklofosfamid, Doksorubicin hidrohlorid, Vinkristin (Oncovin), Prednizolon; CTD - Ciklofosfamid (Endoksan), Talidomid, Deksametazon; DHAP - Deksametazon, visokodozni Ara-C, Platinol (cisplatin); ESHAP - Etopozid, Metilprednizolon, visokodozni Ara-C, Cisplatin; PAD - Bortezomib, Doksorubicin, Deksametazon; R-CD - Rituximab, Ciklofosfamid, Deksametazon; P-CVP - Rituximab, Ciklofosfamid, Vinkristin, Prednizolon; R-EPOCH - Rituximab, Etopozid, Prednizon, Vinkristin, Ciklofosfamid, Doksorubicin; HyperCVAD - Citarbin, Vinkristin, Ciklofosfamid, Doksorubicin, Deksametazon.

Dvadeset i jedan bolesnik (25,3%) je primao profilaktički aciklovir, dok 40 (48,2%) bolesnika nije bilo na ovoj terapiji. Podaci o primeni aciklovira nisu dostupni za 22 (26,5%) bolesnika. Opšte informacije o adultnim bolesnicima kod kojih nije urađena TMČH su prikazane u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Glavne demografske i kliničke karakteristike adultnih hematoloških bolesnika uz njihov HCMV serološki profil.

*	CMV IgG pozitivni	CMV IgG negativni	p-vrednost	
Bolesnici (N, %)	75 (90,4%)	8 (9,6%)	N/A	
Starost (medijana, godine)	50,05	43,75	0,070 <sup>a</sup>	
Starosne kategorije (godine)				
20-39	18 (85,7%)	3 (14,3%)	0,054 <sup>b</sup>	
40-59	34 (89,5%)	4 (10,5%)		
>59	23 (95,8%)	1 (4,2%)		
Pol				
Muški	37 (86%)	6 (14%)	0,266 <sup>c</sup>	
Ženski	38 (95%)	2 (5%)		
Dijagnoze; ICD-O-3 kod*				
Nehoćkinski limfom	33 (94,3%)	2 (5,7%)	0,339 <sup>c</sup>	
Hoćkinova bolest	18 (81,8%)	4 (18,2%)		
B hroniĉna limfocitna leukemija	9 (90%)	1 (10%)		
Valdenstremova makroglobulinemija	2 (100%)	0		
B-ćelijski limfom, NOS	2 (100%)	0		
Plazma-ćelijski mijelom	2 (66,7%)	1 (33,7%)		
Leukemija vlasastih ćelija	2 (100%)	0		
B-ćelijska akutna limfoblastna leukemija	7 (100%)	0		
Antivirusna terapija (Aciklovir)**				
Da	17 (81%)	4 (19%)		0,438 <sup>c</sup>
Ne	36 (89,5%)	4 (10,5)		
Hemioterapija <sup>†</sup>				
Da	38 (92,7%)	3 (7,3%)	0,706 <sup>c</sup>	
Ne	25 (83,3%)	5 (16,7%)		

\* Kodiranje vršeno u skladu sa kriterijumima Klasifikacije onkoloških oboljenja (Svetska Zdravstvena Organizacija) i revizije limfoidnih neoplazija iz 2016. godine [168, 169].

\*\* Podaci nedostaju za 22 bolesnika.

† Podaci nedostaju za 12 bolesnika.

<sup>a</sup> Mann-Whitney U test.

<sup>b</sup> Mantel-Haenszel Hi kvadrat metoda za trend.

<sup>c</sup> Fišerov egzaktni test.

### 3.1.3.2. Kohorta zdravih ispitanika – kontrolna grupa

Kontrolna grupa obuhvatila je 259 odraslih osoba upućenih od nadležnih lekara u Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ radi određivanja serološkog profila anti-HCMV IgM i IgG antitela. Kriterijum isključivanja za kontrolnu grupu je bio dijagnoza

hematološkog malignog oboljenja. Potrebni podaci o ispitanicima su dobijeni iz odgovarajuće dokumentacije. Uputne dijagnoze kontrolne grupe ispitanika se mogu videti u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Uputne dijagnoze kontrolne grupe ispitanika nakon mečovanja za pol i godine.

Šifra dijagnoze*	Dijagnoza	Broj bolesnika
A692	Lajmska bolest	1
A86	Neoznačen virusni encefalitis	1
B008	Drugi oblici herpesvirusnih infekcija	1
B01	Varičela	1
B189	Hronični virusni hepatitis, neoznačen	1
B19	Neoznačen virusni hepatitis	1
B27	Infektivna mononukleoza	1
B279	Infektivna mononukleoza, neoznačena	1
B332	Virusni karditis	1
B34	Virusna infekcija neoznačenog mesta	2
B341	Enterovirusna infekcija, neoznačena	4
B348	Druge virusne infekcije neoznačenog mesta	8
B349	Virusna infekcija, neoznačena	2
C18	Maligna neoplazija debelog creva	1
G90	Poremećaji autonomnog nervnog sistema	1
G900	Idiopatska periferna autonomna neuropatija	1
G908	Drugi poremećaji autonomnog nervnog sistema	1
G933	Postvirusni sindrom zamora	3
I10	Esencijalna (primarna) hipertenzija	3
I30	Akutni perikarditis	3
I308	Drugi oblici akutnog perikarditisa	1
I309	Akutni perikarditis, neoznačen	1
I31	Hronični konstriktivni perikarditis	1
I313	Perikardna efuzija (nezapaljenjska)	1
I341	Nereumatski prolaps mitralnog zaliska	1
I40	Akutni miokarditis	1
I409	Akutni miokarditis, neoznačen	2
I428	Druge kardiomiopatije	1
I429	Kardiomiopatija, neoznačena	1
I49	Druge srčane aritmije	1
I493	Preвременa komorna depolarizacija	1
I88	Nespecifični limfadenitis, neoznačen	1
J01	Akutni sinuzitis	1
N18	Hronična bubrežna bolest	2
N185	Hronična bubrežna bolest, 5. stadijum	1
O208	Drugo krvarenje u ranoj trudnoći	1
O861	Druga infekcija genitalnog trakta nakon porođaja	1
R060	Dispneja	1

R069	Neoznačene abnormalnosti disanja	1
R42	Nesvestica i vrtoglavica	1
R50	Povišena temperature drugog i nepoznatog porekla	1
R500	Febrilno stanje sa drhtavicom	1
R509	Febrilno stanje, neoznačeno	3
R55	Sinkopa i kolaps	8
R933	Nenormalni nalazi kod dijagnostike organa za varenje	1
V830	Vozač specijalnog industrijskog vozila povređen u saobraćajnom udesu	1
Z31	Genetsko savetovanje	1
Z35	Kontrola trudnoće sa visokim rizikom	1
<b>Ukupno:</b>		<b>77</b>

Grupu ispitanika je sačinjavalo 73 (28,18%) muškarca i 186 (71,81%) žena. Prosečna starost kontrolne grupe je bila 41,79 godina (raspon 20-86 godina).

Između grupa bolesnika i kontrolnih ispitanika uočeno je statistički značajno neslaganje u odnosu na pol i godine. Zbog primetne razlike koja bi uticala na ispravno donošenje zaključaka, pre dalje analize izvršeno je statističko mečovanje ispitanika po polu i starosti. Ovakva statistička intervencija je unela izmene u sastav kohorte ispitanika, što se može videti u Tabeli 10. Nakon statističkog mečovanja po ove dve karakteristike, konačnom analizom je obuhvaćeno 77 osoba iz kontrolne grupe.

**Tabela 10.** Podaci o kohortama bolesnika i ispitanika pre i posle mečovanja u odnosu na pol i starost.

Karakteristike kohorte	Pre statističkog slaganja			Posle statističkog slaganja		
	Bolesnici	Kontrole	<i>p</i> -vrednost	Bolesnici	Kontrole	<i>p</i> -vrednost
Broj bolesnika (N)	83	259	N/A	83	77	N/A
Starost i raspon (godine)	49,45 20-73	41,79 20-86	<b>&lt;0,001*</b>	49,45 20-73	48,05 22-86	0,551*
Pol (N, %)						
Muški	43 (51,8%)	73 (28,2%)	<b>&lt;0,001†</b>	43 (51,8%)	29 (37,7%)	0,072†
Ženski	40 (48,2%)	186 (71,8%)		40 (48,2%)	48 (62,3%)	
CMV IgG (N, %)						
Da	75 (90,4%)	214 (82,6%)	0,09†	75 (90,4%)	76 (98,7%)	<b>0,035†</b>
Ne	8 (9,6%)	45 (17,4%)		8 (9,6%)	1 (1,3%)	

\* Mann-Whitney *U* test.

† Fišerov egzaktni test.

## 3.2. Uzorci

---

Uzorci periferne venske krvi u grupi pedijatrijskih bolesnika su sakupljani od januara 2017. godine do oktobra 2018. godine. Zapremina od oko 5 mililitara (ml) periferne venske krvi je uzorkovana u vakutajnere sa EDTA i Na-citratom kao antikoagulantnim sredstvom. Praćenje HCMV infekcije se zasnivalo na uzimanju uzoraka najčešće jednom nedeljno. Uzorci bi potom bili transportovani do virusološke laboratorije Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, gde bi bili podvrgnuti daljoj obradi.

Uzorci su centrifugirani na 3000 ×g tokom 10 minuta, a potom je aspirirano 200 mikrolitara (μl) leukocitno/trombocitnog sloja (engl.: *buffy coat*) i plazme. Ova zapremina uzorka je smeštana u Ependorf tubice zapremine 1,5 ml i potom služila za ekstrakciju virusne DNK.

Za studiju slučajeva i kontrola, uzorci krvi odraslih bolesnika lečenih u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije uzimani su samo jednom tokom lečenja. Zapremina od približno 10 ml periferne venske krvi sakupljena je u vakutajnere sa aktivatorom zgrušavanja i potom transportovana do virusološke laboratorije Instituta za mikrobiologiju i imunologiju. Dobijeni uzorci krvi su koagulirali u vakutajneru, nakon čega su centrifugirani na 3000 ×g tokom 10 minuta kako bi se zgrušana frakcija krvi odvojila od seruma. Sto mikrolitara ovako tretiranog seruma je odvajano u Ependorf tubice zapremine 1,5 ml i korišćeno za određivanje prisustva anti-HCMV IgM i IgG antitela.

Uzorci periferne venske krvi kontrolnih ispitanika su uzimani u Institutu za virusologiju, vakcine i serume "Torlak". Serum je i u ovom slučaju služio kao frakcija krvi za dalju analizu i sledstvenu detekciju anti-HCMV IgM i IgG antitela.

## 3.3. Metodologija

---

### 3.3.1. Etička dozvola

Za obe studije, prospektivnu i retrospektivnu, dobijena je dozvola svih ustanova uključenih u istraživanje. Adultni bolesnici informisani su o koncepciji studije i dali su informisani pristanak za učešće u istraživanju. Roditelji pedijatrijskih bolesnika i pedijatrijski bolesnici stariji od 15 godina su dali informisani pristanak za učešće u studiji.

### 3.3.2. Izolacija virusne DNK

Izolacija virusne DNK je izvršena tehnikom silikonske spin-kolone. Korišćen je komercijalni kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™, Voltam, Masačusec, Sjedinjene Američke Države) prema uputstvu proizvođača.

U prvom koraku u plastičnu epruvetu od 1,5 ml sa 200 μl uzorka dodato je 20 μl enzima proteinaze K i 20 μl RNAze, te je epruveta vorteksovana. Po isteku inkubacije od 2 minuta na sobnoj temperaturi, smeši je dodavano 200 μl Genomic lysis/binding pufera, nakon čega je po vorteksovaju sadržaj inkubiran na 56 °C tokom 10 minuta. Sledeći korak je

podrazumevao dodavanje 200 µl apsolutnog 96-100% etanola u prethodno lizirani uzorak. Smeša alkohola i liziranog uzorka je sipana u spin-kolonu koja se nalazi u odgovarajućoj tubici i izvršeno je centrifugiranje. Zatim su sledila dva koraka ispiranja DNK vezane za silikonsku membranu kolone pomoću pufera za ispiranje.

Poslednji korak podrazumevao je dodavanje 40 µl pufera za eluciju i inkubaciju od 1 minuta na sobnoj temperaturi. Ovom koraku sledi centrifugiranje pri čemu se na kraju dobija filtrat koji sadrži izolovanu DNK.

Ovako rastvorena DNK je služila za skrining i kvantitaciju HCMV u uzorcima pedijatrijskih bolesnika. Za genotipizaciju HCMV, elucija je vršena puferom u zapremini od 30 µl.

### 3.3.3. Detekcija i kvantitacija HCMV DNK

Po izolaciji nukleinskih kiselina, detekcija prisustva HCMV DNK vršena je tehnikom reakcije lančane polimerizacije u realnom vremenu (*Real-Time PCR*), na *Applied Biosystems*<sup>TM</sup> 7500 *Real-Time PCR* mašini (*Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države*). Osnovu ove tehnike čini TaqMan<sup>TM</sup> metoda, koja se zasniva na paru prajmera i jednoj TaqMan<sup>TM</sup> probi koji su specifični za ciljnu virusnu DNK. Proba predstavlja posebno konstruisan oligonukleotidni molekul koji je komplementaran sekvenci HCMV koju ograničavaju pomenuti prajmeri. Karakteristika probe jesu dva fluorescentna molekula vezana za 5' i 3' kraj i koji nose nazive *reporter* i *quencher*, respektivno. Dok su vezani za probu, ovi molekuli ne emituju značajnu fluorescenciju. Ukoliko u datoj PCR smeši postoji ciljna HCMV DNK, polimeraza započinje umnožavanje novog nukleotidnog lanca. U trenutku kada polimeraza dođe do probe, započinje svoju 5'-3' egzonukleaznu aktivnost, što dovodi do odvajanja *reportera* od *quenchera*. *Reporter*, koji više nije u blizini molekula *quenchera*, emituje kvante svetlosti koje potom registruje PCR mašina. Na ovaj način softver beleži emisiju fluorescencije, koja označava prisustvo virusne DNK.

Prajmeri su dizajnirani tako da umnožavaju sekvencu iz regiona HCMV *immediate-early (IE)* gena. TaqMan<sup>TM</sup> proba je obeležena fluorescentnim molekulima na 5' i 3' kraju sa 6-karboksifluorescinom (FAM; *reporter* boja) and 6-karboksitetrametil-rodamidom (TAMRA; *quencher* boja), respektivno. Sekvence prajmera i probe su prikazane u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Sekvence prajmera i probe korišćene u *Real-Time PCR*-u za detekciju i kvantitaciju HCMV.

<b>Prajmer Fw</b>	5'-CGC TCA CAT GCA AGA GTT AAT CTT C-3'
<b>Prajmer Rev</b>	5'-AAC TCG GTA AGT CTG TTG ACA TGT ATG-3'
<b>Proba</b>	5'-FAM CTC TAT CTG ACA TAC ACA AGT AAA TCC ACG TCC CA TAMRA-3'



Određivanje broja kopija nukleinske kiseline HCMV je takođe postignuto *Real-Time* PCR tehnikom. Kvantitativni aspekt *Real-Time* PCR-a se zasniva na metodi standardne krive. Tokom svakog *Real-Time* PCR-a pored negativne kontrole i uzoraka analiziraju se četiri standarda (Clonit Srl, Milano, Italija). Radi se o vodenim rastvorima sa plazmidima koji sadrže virusni ampikon za određeni HCMV *IE* gen u predefinisanim koncentracijama, a za koji su prajmeri i proba u *Real-Time* PCR-u specifično komplementarni. Standardi sadrže  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  i  $10^6$  kopija dela *IE* gena po mililitru. Standardi takođe podležu reakciji lančane polimerizacije i detekciju putem probe kao i bilo koji drugi uzorak u kom bi se našla HCMV DNK.

Pre započinjanja samog *Real-Time* PCR-a, u softveru je neophodno podesiti vrednosti standarda, koje odgovaraju njihovim definisanim koncentracijama, kao i poziciju negativne kontrole i ispitivanih uzoraka. Ovome sledi odgovarajući protokol umnožavanja DNK *Real-Time* PCR-om, a koji je prikazan u Tabeli 12.

**Tabela 12.** Temperaturni profil PCR umnožavanja HCMV DNK.

Denaturacija (T, °C/vreme)	Aniling i ekstenzija (T, °C/vreme)
94 / 3 min	60 / 1min

Kvantitacija pozitivnih uzoraka se postiže metodom standardne krive. *Real-Time* PCR mašina registruje pojavu fluorescencije standarda odgovarajućih koncentracija u tačno određenom ciklusu PCR-a. Standardi većih koncentracija će po pravilu biti registrovani u ranijim ciklusima. Standardna kriva odgovara liniji koja najbolje spaja koncentracije standarda detektovane u ciklusima kada se za njih pojavi fluorescencija.

Za reakcionu smešu u *Real-Time* PCR-u korišćeni su TaqMan™ Master Mix, RNase-free voda, prajmeri, proba i eluat kao uzorak. Reakciona smeša za *Real-Time* PCR zajedno sa svim reagensima i njihovim koncentracijama je prikazana u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Konstituenti reakcione smeše za *Real-Time* PCR i njihove zapremine.

Reagens	Zapremina (µl)
TaqMan™ Master Mix	12,5
Prajmer 1	1
Prajmer 2	1
Proba	1
Voda	4,5
Uzorak	5
<b>Ukupno</b>	<b>25</b>

### 3.3.4. Genotipizacija HCMV na UL55 i UL73 lokusima

Prajmeri koji amplifikuju odgovarajuće regione *UL55* i *UL73* gena su dizajnirani shodno prethodnim istraživanjima [70, 71].

Za genotipizaciju HCMV na *UL55* lokusu koji kodira za gB korišćena je *nested* multipleks PCR metoda. Nakon prvog kruga amplifikacije, produkt predstavlja matricu za naredni korak umnožavanja. U drugom krugu, 6 prajmera je činilo deo reakcione smeše koja je kao rezultat umnožavanja davala 5 različitih amplikona. Svaki od produkata drugog kruga je predstavljao jedan od ispitivanih gB genotipova (gB1, gB2, gB3, gB4 i gB5).

Za genotipizaciju HCMV na *UL73* lokusu koji kodira za gN korišćena je *nested* multipleks PCR metoda. Nakon prvog kruga amplifikacije, produkt je predstavljao matricu za naredni korak umnožavanja. U drugom krugu, 6 prajmera je činilo deo reakcione smeše koja je kao rezultat umnožavanja davala 5 različitih amplikona. Svaki od produkata drugog kruga je predstavljao jedan od ispitivanih gN genotipova (gN1, gN2, gN3b, gN4a i gN4b/c).

Sekvence prajmera korišćenih u genotipizaciji HCMV, kao i temperaturni profili za *nested* multipleks PCR su prikazani u Tabeli 14.

**Tabela 14.** Sekvence prajmera i uslovi PCR-a za genotipizaciju HCMV na *UL55* i *UL73* lokusima.

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	PCR profil (temperatura/vreme)						Veličina ampikona (bp)
			ID	D	A	E	KE	Ciklusi	
<b><i>UL55 (gB)</i></b>									
1. krug	UL55 up	TTTGGAGAAAACGCCGAC	95 / 5 min	94 / 1 min	50 / 1 min	72 / 1 min	72 / 10 min	40	751
	UL55 low	CGCGCGGCAATCGGTTTGTGTGTA							
2. krug	gB1	ATGACCGCCACTTTCTTATC	94 / 2 min	94 / 30 sec	53 / 1 min	72 / 90 secs	72 / 10 min	35	420
	gB2	TTCGACTTTGGAAGACCCAACG							613
	gB3	TAGCTCCGGTGTGAACTCC							190
	gB4	ACCATTTCGTTCCGAAGCCGAGG AGTCA							465
	gB5	TACCCTATCGCTGGAGAAC							139
	gB low	GTTGATCCACACACCAGGC							
<b><i>UL73 (gN)</i></b>									
1. krug	UL73 up	AGTCGATTCGGTCGGTTAAC	95 / 5 min	94 / 1 min	50 / 1 min	72 / 1 min	72 / 10 min	40	469
	UL73 low	CCACCCTCAATAGCCTTTGGT							
2. krug	gN1	TTCGCTAGCGTATCAACTACC	95 / 5 min	94 / 1 min	50 / 1 min	72 / 1 min	72 / 10 min	40	283
	gN2	AGTGCAAAACACTGGTGCT							380
	gN3b	CACAACCACATTAACGAGT							214
	gN4a	CAACAATACGTCGACTGCTAGC ACAC							325
	gN4b/c	GACAAGTAGTACAACACTACGGTG ACAA							244
	gN low	GACATTGCTGCTTCCAGAA							

ID - inicijalna denaturacija; D - denaturacija; A - aniling; E - elongacija; KE - konačna elongacija; bp - bazni parovi

Konačna identifikacija HCMV genotipa je bila moguća po vizuelizaciji produkata drugog kruga *nested* multipleks PCR-a, što je učinjeno gel elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

Osnovni princip ove metode se zasniva na činjenici da se nukleinske kiseline različitih masa kreću različitom brzinom u odgovarajućem medijumu, a pod dejstvom električnog polja. Za pravljenje gela za elektroforezu je korišćen pufer Tris Acetat EDTA (40 mM Tris Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5; TA) i agar. Agarozni gel 2% koncentracije je pravljen tako što je 2 gr agaroze rastvoreno u 100 ml TAE pufera. Rastvor je, potom, zagrevan do tačke topljenja agara, nakon čega je u njega dodato 8 µl etidijum-bromida, koji će poslužiti u koraku vizuelizacije produkta. Etidijum bromid (EtBr 25 µg/ml, *Serva Electrophoresis GmbH*, Hajdelberg, Nemačka) je interkalirajući agens koji ima sposobnost da se veže za vodonične veze u dvolančanom molekulu DNK. Pod dejstvom ultravioletnog (UV) zračenja etidijum bromid emituje svetlost u vidljivom delu spektra, tako da se DNK molekuli u koje je ugrađen etidijum bromid raspoznaju kao trake na agaroznom gelu.

Gel je razlivan u kalupe koji po hlađenju rastvora omogućuju formiranje bunarčića – malih udubljenja na odgovarajućim delovima gela u koje je moguće pipetirati amplifikovani produkt PCR-a. Po hlađenju agaroze, u formirane bunarčiće u gelu su sipani uzorci. Ovi produkti bi pre nanošenja na gel bili pomešani sa puferom za punjenje (PP; 250 mg/ml saharoze i 2,5 mg/ml bromfenol plavog). Pufer omogućava vizuelizaciju uzorka na gelu, kao i praćenje njihovog kretanja. U bunarčiće je potom unošeno po 8 µl PCR produkta pomešanih sa 2 µl PP.

Kako bi se mogla odrediti veličina amplifikovanog produkta, u pojedine bunarčiće je pomešan sa PP sipan i *ladder* (DNK Standard 100bp – *Serva Electrophoresis GmbH*, Hajdelberg, Nemačka), komercijalna smeša nukleinskih kiselina predefinisane i poznate veličine od 100 do 1000 baznih parova. Svaki od ovih fragmenata predstavlja DNK isečenu resrtikcionim enzimima koja služi kao marker. Poređenjem veličine ispitivanog amplikona sa DNK markerom se vrši identifikacija PCR produkta.

Formirani gelovi ohlađeni na sobnu temperaturu su smešteni u kadice za elektroforezu, posebne plastične sudove koji povezani sa izvorom električne energije omogućavaju formiranje električnog polja. Kroz gelove sa već dodatim uzorcima i DNK markerom bi se propuštala električna energija, pri čemu bi uzorci u gelu migrirali od negativne ka pozitivnoj elektrodi.

Vizuelizacija DNK izvršena je pod UV svetlom uz pomoć etidijum bromida koristeći ultravioletni transiluminator. Tako prikazani gelovi su mogli biti snimljeni na poseban kompjuter koristeći program za fotodokumentaciju.

Svaki od genotipova *UL55* i *UL73* gena nakon *nested* multipleks PCR-a ima odgovarajuću dužinu izraženu brojem baznih parova. Poređenjem ove dužine sa markerom se jasno identifikovao svaki gB i gN genotip.

### 3.3.5. Serološka ispitivanja

Serološke analize su metode koje se zasnivaju na detekciji antitela u uzorcima, najčešće serumu. Jedan od najkorišćenijih testova u ove svrhe jeste ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

Serološka ispitivanja su sprovedena u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu i u Institutu za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", pri čemu su bolesnički uzorci analizirani u prvoj, a uzorci kontrolnih ispitanika u drugoj ustanovi. Citomegalovirusna seropozitivnost je bazirana na detekciji IgG antitela u uzorku seruma čije je prisustvo određeno komercijalnim ELISA testovima.

Za detekciju anti-HCMV IgG antitela bolesnika korišćen je komercijalni kit kompanije EUROIMMUN (Libek, Nemačka). Detekcija antitela je izvođena u mikroploči koja je deo samog kita, a rezultati izraženi u relativnim jedinicama po mililitru (RU/ml).

Za detekciju anti-HCMV IgG antitela u kontrolnoj grupi osoba bez dokazanog hematološkog malignog oboljenja korišćen je komercijalni kit od strane proizvođača *Enzygnost* (Marburg, Nemačka), pri čemu je detekcija rađena na *Multiskan Ex ELISA Reader* aparatu (*Thermo Electron Corporation, Voltam, Masačusec, SAD*).

Za očitavanje rezultata ELISA-e, korišćen je spektrofotometar *ELISA Reader 270* (*bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska*).

Da bi se rezultati smatrali validnim, kalibrator, pozitivna i negativna kontrola su morali pokazati odgovarajuću ekstinkciju, odnosno količinu RU/ml u vrednostima prihvatljivim za kit proizvođača. Ukoliko bi svi uslovi bili ispunjeni, računata je vredost RU/ml za svaki uzorak metodom kalibracione krive.

### 3.3.6. Definicije HCMV infekcije

Ispitanici su smatrani HCMV seropozitivnim u slučaju prisustva anti-HCMV IgG antitela u serumu, što je ukazivalo na prethodni kontakt sa ovim patogenom. Citomegalovirusna seroprevalencija je definisana kao učestalost HCMV seropozitivnih osoba u populaciji adultnih, netransplantiranih bolesnika sa hematološkim malignim bolestima [55]. Kriterijum za postavljanje dijagnoze HCMV infekcije je bio detekcija virusne DNK u krvi *Real-Time PCR*-om [72, 73].

### 3.3.7. Podaci o globalnom opterećenju B-limfoidnim neoplazijama - studija slučajeva i kontrola

Deo studije slučajeva i kontrola se odnosio na sakupljanje publikovanih podataka o HCMV seroprevalencijama i globalnom opterećenju tumorima porekla B-ćelija. Kao pretraživač je korišćen vebsajt *PubMed* ([www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)). U analizu su uključeni i podaci o deskriptivnoj epidemiologiji B-ćelijskih oboljenja, kao i informacije iz referenci u radovima dobijenim pretragom *PubMed*-a. Incidencije ispitivanih B-limfoidnih malignih bolesti su preuzete sa platforme Svetske Zdravstvene Organizacije "Global Cancer Observatory" (GLOBOCAN) [74].

U istraživanju vezanom za disertaciju korišćene su sumirane aproksimativne godišnje stope incidencije B-ćelijskih limfoproliferativnih oboljenja na 100 000 stanovnika (Tabele 15 i 16). Sumiranje stopa je povećalo njihovu statističku snagu i jednostavnost interpretacije. Po sumiranju, ove incidencije podešene prema starosti su okvirno potvrđivale poznate rasne i međuetničke razlike u HCMV prevalencijama.

**Tabela 15.** Podaci o HCMV seropozitivnosti i varijacije sumiranih incidencija B-limfoidnih bolesti u određenim delovima sveta.

Populacija	CMV+ (%)	B-ćelijske maligne bolesti ‡	p-vrednost	Reference
SAD*	44	44,72	N/A	Chihara <i>et al.</i> [167] SEER Program (170)
SAD* (osobe azijskog porekla)	75	18,6	<0,05	Clarke <i>et al.</i> [164] Li <i>et al.</i> [165]
Evropa	70	25,44	<0,05	Zuhair <i>et al.</i> [58]
Bliski Istok (Irak, Jordan, Saudijska Arabija)	90	9,12	<0,05	Yaquo <i>et al.</i> [171]
Sub-saharska Afrika	~92	7,2	<0,05	Tomoka <i>et al.</i> [172]
Hong Kong	>90	11,49	<0,05	Bassig <i>et al.</i> [173]
Istočna Azija (Kina, Japan)	~90	8,72	<0,05	Chihara <i>et al.</i> [167]

\* SAD - Sjedinjene Američke Države.

‡ (sumirane stope na 10<sup>5</sup> stanovnika godišnje)

**Tabela 16.** Aproximirane incidencije ključnih B-ćelijskih malignih bolesti: procene stopa u odnosu na rasu i etničko poreklo.

Zemlja (rasa/etnička pripadnost)	Limfoidno maligno oboljenje: Aproximativna godišnja incidencija na 100 000 stanovnika					Procena sumirane incidencije
	Nehoćkinski limfom	Hoćkinova bolest	B-ALL‡	B-CLL†	Plazma-ćelijski mijelom	
SAD*	27,4	3,23	1,69	6,3	6,1	44,72
SAD* (osobe azijskog porekla)	11,8	1,28	0,7	1,8	3,2	18,6
Evropa	11,6	3,58	0,68	4,88	4,7	25,44
Bliski Istok	4,9	1,45	0,56	0,71	1,5	9,12
Supraharska Afrika	5,5	0,7	0,35	0,36	0,29	7,2
Hong Kong	6,68	0,62	1,28	0,6	2,31	11,49
Istočna Azija (Kina, Japan)	4,8	0,53	0,96	1,13	1,3	8,72

\* SAD - Sjedinjene Američke Države.

‡ B-ALL - B akutna limfoblastna leukemija.

† B-CLL - B hronična limfoblastna leukemija.

### 3.3.8. Statistička analiza

#### 3.3.8.1. Statistička analiza podataka iz prospektivne studije

Za statističku analizu je korišćen softver *IBM® SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows. IBM Corporation, Armonk, Njujork, Sjedinjene Američke Države)*. Razlike su smatrane statistički značajnim za svaku  $p$ -vrednost manju od 0,05. U studiji pedijatrijske kohorte kod kojih su urađene alogena i autologna TMČH, podaci su analizirani putem statističkih metoda *Wilcoxon-Mann-Whitney*, Fišerovog egzaktnog testa i *Phi* metode. U studiji pedijatrijske kohorte sa isključivo alogenom TMČH statistička izračunavanja su vršena Hi-kvadrat testom za kategoričke varijable, dok su skalarni i nominalni podaci analizirani *Wilcoxon-Mann-Whitney* testom. Povezanost numeričkih varijabli, uzrasta bolesnika i viremije, ispitivana je Pirsonovom korelacijom.

#### 3.3.8.2. Statistička analiza podataka iz retrospektivne studije slučajeva i kontrola

Celokupna statistička analiza je vršena u softveru *IBM® SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows. IBM Corporation, Armonk, Njujork, Sjedinjene Američke Države)*. Razlike su smatrane statistički značajnim za svaku  $p$ -vrednost manju od 0,05. U zavisnosti od tipa podatka, rezultati su predstavljeni kao procenti (u zagradama) ili medijane (interkvartilni raspon) i distribucije frekvencije. Univarijantna analiza Fišerovim egzaktnim testom je korišćena za statističku karakterizaciju značajnosti razlike između kategoričkih varijabli. *Mann-Whitney U Test* je omogućio deskriptivno poređenje dve kohorte (bolesnika i kontrola) ili kliničkih stanja i terapija. Kao metoda je primenjena i binarna logistička regresija. Upoređivanje HCMV prevalencije i godišnje incidencije limfoidnih malignih oboljenja je izvršeno metodom korelacije po Spirmanu.

# Rezultati

---

## ***4.1. HCMV infekcija pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze – prospektivna studija***

---

Istraživanjem je obuhvaćeno 42 pedijatrijska bolesnika lečena u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”, Odeljenje za trasplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju.

Za studiju su korišćeni uzorci periferne venske krvi sakupljeni u periodu od januara 2017. do oktobra 2018. godine. Uzorci su po uzimanju transportovani do Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, gde su potom podvrgnuti daljoj obradi i analizi.

Nukleinske kiseline ekstrahovane iz bolesničkih uzoraka su služile za detekciju, kvantitaciju i genotipizaciju HCMV. Rezultati molekularnih analiza su upoređivani sa osnovnim, anamnestičkim i kliničkim podacima ispitivane pedijatrijske populacije.

### ***4.1.1. Incidencija HCMV infekcije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena i autologna TMČH***

Incidencija HCMV infekcije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena i autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze je bila 57,1% (24/42).

Ispitanici sa HCMV infekcijom (6 godina, raspon 2-21) su bili mlađi od dece kod koje nije dokazano prisustvo ovog virusa (9,75 godina, raspon 2,5-17), mada razlika nije statistički značajna ( $p>0,05$ ).

HCMV infekcija je dokazana u 56,5% (13/23) dečaka i 57,9% (11/19) devojčica. Značajna razlika u incidenciji viremije nije dokazana u odnosu na pol, iako je patogen bio češće prisutan u ženskih bolesnika ( $p>0,05$ ).

Viremija je detektovana isključivo u alogeno transplantiranim bolesnicima ( $p<0,05$ ). U ovoj grupi, infekcija HCMV je pokazana u 24 (72,7%) bolesnika, dok u 9 (27,3%) prisustvo virusa nije dokazano.

U zavisnosti od tipa alogene TMČH, viremija je detektovana u 9 (27,8%) bolesnika sa MUD. Podjednak broj bolesnika sa HID je imao HCMV infekciju (27,8%), dok je virus dijagnostikovao kod 5 (15,2%) bolesnika sa MSD. Infekcija je uočena i kod jednog bolesnika kod kog je urađena TMČH iz pupčane vrpce.



Ni kod jednog od bolesnika kod kojih je urađena autologna TMČH nije dokazano prisustvo traženog patogena.

U kohorti bolesnika kod kojih je urađena autologna i alogena TMČH osnovna bolest nije bila značajan faktor povezan sa HCMV infekcijom, iako je viremija predominirala u ispitanika sa nemalignom bolešću (83,3% naspram 52,8%,  $p>0,05$ ).

Bolest kalema-protiv-domaćina je značajno češće dijagnostikovana u dece sa HCMV infekcijom ( $p=0,001$ ).

#### ***4.1.2. Incidencija HCMV infekcije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH***

Incidencija HCMV infekcije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH bila je 71,9% (23/32).

Prosečan uzrast bolesnika sa HCMV infekcijom bio je 8,93 godine, dok je prosečan uzrast ispitanika kod kojih prisustvo virusa nije dokazano bila 7,66 godina. Procenti dečaka i devojčica sa detektabilnom viremijom su bili slični i iznosili su 72,2% i 71,4%, respektivno.

Uzrast i pol se nisu pokazali kao statistički značajni faktori ( $p>0,05$ ), iako je primećeno da češće stariji ispitanici i dečaci razvijaju HCMV infekciju.

Infekcija HCMV je dokazana u 9 (39,1%) bolesnika sa HID, 8 (80%) bolesnika sa MUD, 5 (41,7%) bolesnika sa MSD i u jednog primaoca matičnih ćelija pupčane vrpce. Viremija je značajno češće detektovana u primalaca sa HID nego u drugim oblicima TMČH ( $p=0,015$ ). Suprotno tome, detekcija virusne DNK u perifernoj krvi je bila ređi događaj kod bolesnika sa MSD ( $p=0,006$ ) u odnosu na druge tipove alogene TMČH.

Osobe sa malignim tumorom (16/23, 69,6%) kao osnovnom bolešću su češće imale HCMV infekciju nego oni sa nemaligim oboljenjem (7/23, 30,4%), iako ova razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p>0,05$ ).

Infekcija HCMV nije značajno korelirala sa post-transplantacionim komplikacijama kao što su mukozitis, febrilna neutropenija, sepsa, hepatička veno-okluzivna bolest (VOD), pneumonija i hemoragijski cistitis. Iako nije primećen značajan odnos između incidencije viremije i GvHD, u uzorcima krvi ovih bolesnika je češće dokazivana virusna DNK ( $p>0,05$ ).

Uporedne karakteristike bolesnika sa i bez HCMV viremije su prikazane u Tabeli 5.

#### ***4.1.3. HCMV infekcija i kliničke karakteristike u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena i autologna TMČH***

Post-transplantacione komplikacije bile su prisutne kod svih bolesnika i to kao GvHD (27 bolesnika, 64,28%), mukozitis (38 bolesnika, 90,47%), febrilna neutropenija (38 bolesnika, 90,47%), sepsa (3 bolesnika, 7,14%), VOD (6 bolesnika, 14,28%), pneumonija (2 bolesnika 4,76%), retinitis (1 bolesnik, 2,38%) i hemoragijski cistitis (1 bolesnik, 2,38%).

Bolesnici sa GvHD (74%) su češće imali HCMV infekciju nego bolesnici bez GvHD (26%) ( $p=0,001$ ).

Mukozitis, febrilna neutropenija, sepsa i hemoragijski cistitis su dijagnostikovani sa većom učestalošću u ispitanika sa viremijom, iako njihova pojava nije bila značajno frekventnija nego kod bolesnika bez HCMV infekcije ( $p>0,05$ ). Pneumonija i VOD su bili podjednako često prisutni i u jednoj i u drugoj grupi bolesnika ( $p>0,05$ ). Kod jednog bolesnika je dijagnostikovana retinitis, ali nije detektovano prisustvo HCMV DNK.

Povoljan ishod tokom trajanja studije imalo je 24 bolesnika (57,14%), nasuprot 12 (28,57%) kod kojih je ishod bio letalan. Za 6 bolesnika (14,28%) ovaj podatak nije dobijen.

Od bolesnika kod kojih je detektovana HCMV DNK, 8 (66,7%) je imalo smrtni ishod. Nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju između bolesnika koji su razvili HCMV infekciju i onih koji nisu, iako je veći procenat preminulih u grupi bolesnika sa viremijom.

Usporedne karakteristike bolesnika sa i bez HCMV viremije su prikazane u Tabeli 4.

#### **4.1.4. Viremija u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH**

Količina virusa u krvi izražena u kopijama DNK/ml određivana je *Real-Time* PCR metodom na uzorku nukleinskih kiselina ekstrahovanih iz 200  $\mu$ l *buffy coat*-a i plazme.

Prosečan broj kopija je bio 277 329/ml, sa rasponom od 102 do 2 900 000 kopija/ml.

Viremija nije korelirala sa starošću bolesnika ( $p>0,05$ ). Nasuprot ovome, uočena je značajna veza između pola i broja kopija HCMV DNK, pri čemu su devojčice imale više vrednosti viremije od dečaka ( $p=0,041$ ).

U odnosu na oblik TMČH, viremije su bile niže kod bolesnika sa HID i MUD, dok je suprotno primećeno u primalaca MSD transplantata. Ove razlike nisu bile statistički značajne.

Bolesnici sa malignim oboljenjem su imali značajno više vrednosti HCMV viremije nego ispitanici sa nemalignom osnovnom bolešću ( $p=0,019$ ).

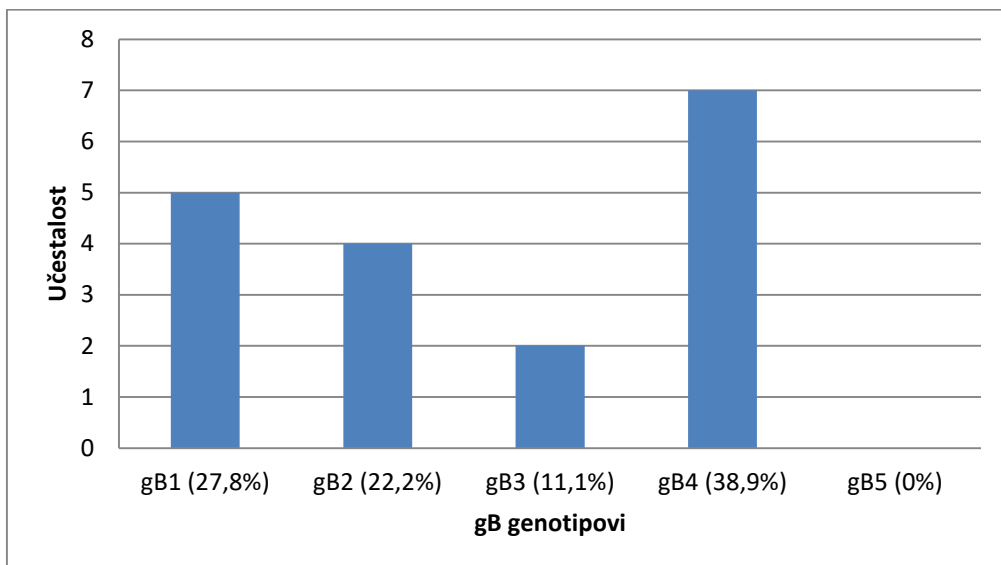
Nijedna od medicinskih komplikacija koje se mogu javiti posle alogene TMČH nije dovedena u značajnu vezu sa viremijom. Iako je broj kopija virusne nukleinske kiseline bio viši u osoba sa GvHD nego kod bolesnika bez ove komplikacije, razlika između dve grupe nije bila značajna.

#### **4.1.5. Distribucija gB i gN genotipova u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena i autologna TMČH**

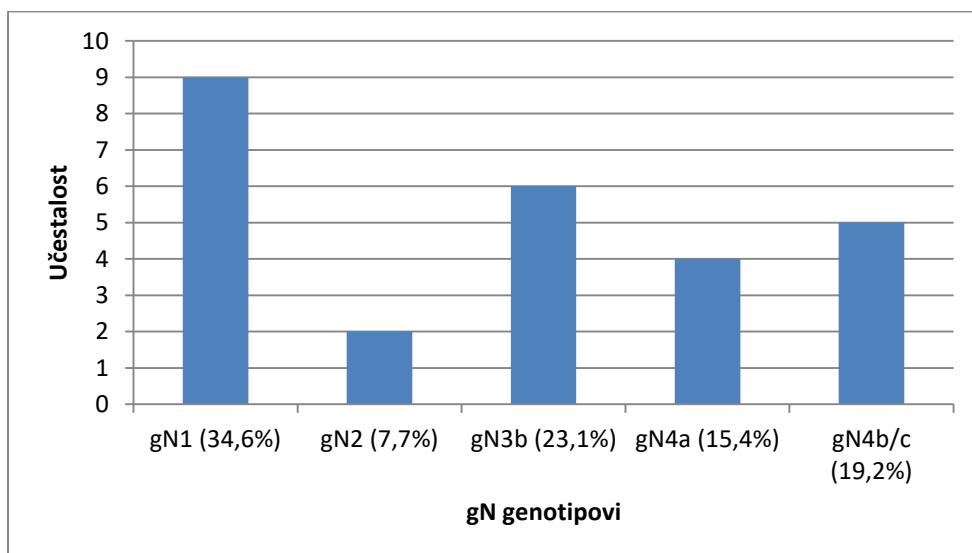
Uzorci bolesnika kod kojih je u toku praćenja dokazana HCMV infekcija su genotipizirani na *UL55* i *UL73* lokusima. Genotipizacija je postignuta primenom multipleks *nested* PCR metode. Svaki od genotipova je predstavljen amplikonom karakteristične dužine baznih parova, te su identifikovani primenom elektroforeze u agaroznom gelu.

Na lokusu za *UL55* gen, molekularnim metodama je otkriveno prisustvo četiri glavna HCMV genotipa (gB1, gB2, gB3 i gB4). Genotipizacija gB je bila uspešna u 14/24 (58,3%) bolesnika, pri čemu je prisustvo genotipova detektovano u 18 slučajeva. Genotip gB4 je bio najučestaliji genotip u deca kod koje je urađena alogena TMČH (7 bolesnika, 38,9%). U uzorcima su se ređe javljali gB1 (27,8%), gB2 (22,2%) i gB3 (11,1%). Prisustvo petog, neprototipskog genotipa gB5 nije primećeno. Učestalost pojave različitih gB genotipova je predstavljena na Slici 10.

Multipleks *nested* PCR metodom je detektovano pet genotipova *UL73* gena: gN1, gN2, gN3b, gN4a, i gN4b/c. Uspešna genotipizacija je postignuta u 19/24 (79,2%) bolesnika inficiranih HCMV. Najučestaliji genotip je bio gN1, otkriven u 9/26 (34,6%) slučajeva. U uzorcima su se ređe javljali gN3b (23,1%), gN4b/c (19,2%) i gN4a (15,4%). Genotip sa najmanjom učestalošću u pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH je bio gN2 (7,7%). Učestalost pojave različitih gN genotipova je predstavljena na Slici 11.



**Slika 10.** Učestalost pojave gB genotipova u kohorti dece kod koje je urađena alogena ili autologna TMČH.



**Slika 11.** Učestalost pojave gN genotipova u kohorti dece kod koje je urađena alogena ili autologna TMČH.

#### 4.1.6. Infekcije sa više HCMV genotipova (mešane infekcije)

Pojava kod koje je u uzorku jednog bolesnika detektovano dva ili više gB ili gN genotipova naziva se mešana infekcija. Ovakva koincidencija više od jednog genotipa je opisana u 6/24 (25%) bolesnika pedijatrijske kohorte.

Više mešanih infekcija je opisano sa gN nego sa gB genotipskim profilom (4 i 3, respektivno). Pet (83,3%) bolesnika je imalo mešanu infekciju samo sa jednim genotipom (ili gB ili gN), dok je kod jednog bolesnika (16,7%) detektovano više genotipova (i gB i gN) na oba ispitivana genska lokusa.

Profil genotipova i subgenotipova mešanih infekcija je prikazan u Tabeli 17.

**Tabela 17.** Genotipovi i subgenotipovi mešanih infekcija.

Genotip	Profil mešane infekcije
gB	gB1 + gB2
	gB3 + gB4
	gB2 + gB3 + gB4
gN	gN1 + gN4a
	gN3b + gN4b/c
	gN1 + gN3b + gN4a
	gN1 + gN2 + gN3b + gN4a

#### 4.1.7. Korelacija mešanih infekcija i kliničkih manifestacija bolesti u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena TMČH

Bolesnici kod kojih su otkriveni različiti genotipovi HCMV (mešane infekcije) češće razvijaju nepovljan (letalni) klinički ishod u odnosu na bolesnike sa infekcijom samo jednim genotipom. Međutim, statistička značajnost ovog nalaza nije pokazana.

Mešane infekcije su ređe primećene kod bolesnika sa GvHD, mukozitisom, febrilnom neutropenijom i VOD, iako bez statističke značajnosti ( $p > 0,05$ ). Bolesnik sa hemoragijskim cistitisom nije imao infekciju sa više genotipova, dok kod bolesnika sa retinitisom nije opisana HCMV viremija. Osobe koje su razvile sepsu kao komplikaciju su imale podjednak broj mešanih infekcija i infekcija sa jednim genotipom. Kod bolesnika sa pneumonijom nije dokazano prisustvo nijednog od traženih genotipova, uprkos dokazanoj HCMV DNK u uzorku. Iako je većina bolesnika sa GvHD imala infekciju jednim genotipom, interesantno je napomenuti da je 4/5 (80%) ispitanika sa mešanom HCMV infekcijom, zapravo, imalo GvHD.

Smrtni ishod je bio češći kod bolesnika sa mešanom genotipskom infekcijom, ali ne i statistički značajno u odnosu na bolesnike sa jednim genotipom ( $p > 0,05$ ).

Odnos kliničkih komplikacija i ishoda kod bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH je prikazan u Tabeli 18.

**Tabela 18.** Kliničke komplikacije i ishodi kod bolesnika sa mešanim genotipskim infekcijama.

Kliničke komplikacije	Infekcija jednim genotipom	Infekcija mešanim genotipovima	<i>p</i> -vrednost
GvHD	15	4	>0.05
Mukozitis	15	5	>0.05
Febrilna neutropenija	15	5	>0.05
Sepsa	1	1	>0.05
VOD	2	1	>0.05
Pneumonija	0	0	N/A
Hemoragični cistitis	1	0	>0.05
<b>Ishodi lečenja</b>			>0.05
Povoljni	11	4	
Letalni	5	2	

N/A - nije primenljivo.

#### 4.1.8. Intra- i intergenotipske asocijacije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH

Proučavajući distribuciju genotipova u dece kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH, uočena je povezanost između pojedinih varijanti – kako između gB i gN genotipova, tako i unutar samog gB klastera.

Sa značajno povećanom učestalošću istovremeno su detektovani gB1 i gB2 ( $p=0,036$ ), gB1 i gN1 ( $p=0,009$ ), kao i gB4 i gN3b ( $p=0,037$ ). Suprotno ovome, neki genotipovi su imali tendenciju da se ne pojavljuju zajedno, i to gB1 i gN4b/c ( $p=-0,022$ ) i gB2 i gN3b ( $p=-0,011$ ). Nedvosmislena negativna korelacija nije uočena za gB2 i gB4, ali je povezanost ova dva genotipa bila bliska značajnoj ( $p=-0,054$ ).

Analize korelacije genotipa su vršene *Phi* metodom. Prikaz odnosa detektovanih genotipova u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH se nalazi u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Odnos između gB i gN genotipova kod pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH.

Genotip	gB1	gB2	gB3	gB4	gN1	gN2	gN3b	gN4a
gB2	.036*							
gB3	-.163	.265						
gB4	-.349	-.054	.467					
gN1	.009*	.572	.069	.244				
gN2	-.163	.265	1.000	.467	.069			
gN3b	.167	-.011*	.168	.037*	-.071	.168		
gN4a	.314	.092	.265	.195	.337	.265	.250	
gN4bc	-.022*	-.242	-.163	-.349	-.423	-.163	-.073	-.242

\* statistički značajna asocijacija između genotipova

#### 4.1.9. Odnos HCMV genotipskih varijanti i kliničkih komplikacija u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH

Najčešće genotipske varijante u odnosu na spektar svih kliničkih komplikacija su bile gB4 i gN1, koje su detektovane u 15 (36,6%) i 25 (40,3%) slučajeva, respektivno.

Genotipovi koji su najređe dokazivani su bili gB3 (7,3%) i gN2 (4,8%). U deca sa povoljnim ishodom, najčešći genotipovi su bili gB4 (36,4%) i gN1 (27,8%). Najčešće detektovani genotipovi u preminulih bolesnika su bili gB1 (3/6, 50%) i gN1 (3/6, 50%).

Odnos pojedinačnih genotipova i kliničkih komplikacija je prikazan u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Distribucija varijanti gB i gN genotipova u odnosu na kliničke komplikacije i ishod bolesti.

Kliničke komplikacije	Genotipovi HCMV									
	gB1	gB2	gB3	gB4	gB5	gN1	gN2	gN3b	gN4a	gN4b/c
GvHD	5	3	0	3	0	8	0	3	3	5
Mukozitis	5	3	1	5	0	7	1	3	3	5
Febrilna neutropenija	4	3	1	5	0	8	1	3	3	4
Sepsa	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0
VOD	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Pneumonija	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemoragijski cistitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Ukupni ishodi</b>	14	9	3	15	0	25	3	9	9	16
Povoljni	2	3	2	4	0	5	2	4	4	3
Letalni	3	1	0	2	0	3	0	1	0	2

#### 4.1.10. Povezanost viremije i genotipa u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH

Vrednosti viremije su uspešno određene kod svih HCMV-pozitivnih bolesnika. Srednja vrednost količine HCMV DNK je bila 267 351 kopija/ml, sa rasponom od 100 do 2 900 000 kopija/ml.

Genotipovi uočeni u uzorcima sa najvišim viremijama su bili gB1 i gN4b/c sa 1 835 000 k/ml. U uzorcima sa najnižim viremijama (<500 k/ml) su detektovani gB4, gB5 i gN4b/c. Genotipski profili zajedno sa količinom virusne DNK su prikazani u Tabeli 21.

Nije uočena povezanost između određene kliničke komplikacije i visine viremije ( $p>0,05$ ). Količina HCMV DNK takođe nije značajno varirala između bolesnika sa jednim genotipom i ispitanika sa mešanom infekcijom ( $p>0,05$ ).

**Tabela 21.** Varijante HCMV gB i gN genotipova prikazane u odnosu na visinu viremije.

Viremija (kopije virusne DNK po mililitru)	gB genotip	gN genotip
2900000	N/A	N/A
1835000	1	4b/c
1405728	4	1
84000	N/A	1
39000	N/A	4b/c
37866	3, 4	2
32559	1	3b
29264	5	3b, 4b/c
12980	2	1
8006	1, 2	1
7808	4	3b
5596	1	1, 3b, 4a
5540	2	1
3102	4	1, 4a
2712	5	3b
1900	N/A	N/A
1182	2, 3, 4, 5	1, 2, 3b, 4a
966	4	1
961	N/A	N/A
895	1	4a
800	5	4b/c
282	5	4b/c
195	4	N/A
100	N/A	N/A

N/A - na genskom lokusu za dati genotip nije dobijen nijedan od traženih genotipova.

## ***4.2. HCMV infekcija u odraslih bolesnika sa hematološkim malignim bolestima – retrospektivna studija slučajeva i kontrola***

---

Retrospektivno istraživanje je sprovedeno kod 83 adultna bolesnika sa hematološkim malignim bolestima i 293 ispitanika koji su pripadali kontrolnoj grupi osoba bez hematološkog oboljenja. Podaci vezani za kontrolnu grupu su dobijeni iz odgovarajuće dokumentacije sa Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak".

### ***4.2.1. Prokuženost HCMV u grupi bolesnika sa hematološkim malignim bolestima***

Jedan od ciljeva ove studije je bio da se utvrdi seroprevalencija HCMV u odraslih osoba sa B-ćelijskim malignim oboljenjima. Odnos HCMV seropozitivnosti unutar grupe bolesnika prikazan je u Tabeli 8.

Najviše IgG pozitivnih bolesnika je bilo prisutno u osoba sa NHL (33/35, 94,3%). Nešto manja prokuženost virusom je uočena u ispitanika sa dijagnozom B-CLL (8/9, 88,9%) i Hočkinovom bolešću (13/17, 76,5%). Citomegalovirus je bio najređe prisutan kod bolesnika sa multiplim mijelomom (2/3, 66,7%), leukemijom vlasastih ćelija (2/2), Valdenstremovom makroglobulinemijom (2/2) i neoznačenim B-ćelijskim limfomom (2/2).

Bolesnici pozitivni na HCMV IgG su bili stariji od osoba koje nisu bile u kontaktu sa patogenom, iako ne značajno ( $p=0,07$ ).

Bolesnici su podeljeni na 3 starosne grupe, i to 20-39 godina, 40-59 godina i >59 godina. Prevalenca HCMV infekcije po ovim grupama bila je 85,7%, 89,5% i 95,8%, respektivno.

Posmatrajući diskretne starosne kategorije, uočena je jasna tendencija povećanja prevalencije HCMV IgG seropozitivnosti sa porastom godina. Ovaj uporedni rast starosti i HCMV prokuženosti je bio blizu statističke značajnosti ( $p=0,054$ ).

Žene su bile češće prokužene u odnosu na muškarce, mada u ovom slučaju nije uočena statistička značajnost ( $p=0,266$ ).

Nije uočena značajna povezanost između primene hemioterapijskog protokola i seropozitivnosti ( $p=0,706$ ), kao ni kod upotrebe antivirusne terapije aciklovirom ( $p=0,438$ ).

### ***4.2.2. Odnos HCMV infekcije između grupe bolesnika sa hematološkim malignim oboljenjem i kontrolne grupe***

Serumi bolesnika i kontrolnih ispitanika su korišćeni za detekciju serološkog profila HCMV, odnosno prisustva anti-HCMV IgM i IgG antitela. Po inicijalnoj statističkoj analizi, uočena je značajna razlika u odnosu na pol i godine između dve grupe ( $p<0,001$ ). Nakon statističkog mečovanja pomenutih parametara, kohortu ispitanika bez maligne bolesti je sačinjavalo 77 odraslih osoba, od kojih 29 (37,7%) muškaraca i 48 (62,3%) žena. Korigovana prosečna starost iznosila je 48,05 godina (raspon 22–86 godina).

Serološka analiza na prisustvo anti-HCMV IgG antitela je uspešno urađena u obe grupe ispitanika. U kohorti bolesnika 75 (90,4%) osoba je bilo seropozitivno za HCMV, dok



8 (9,6%) bolesnika nije bilo u prethodnom kontaktu sa ovim patogenom. Pre mečovanja, 214 (82,6%) uzoraka iz kontrolne grupe je pokazalo prisustvo IgG anti-HCMV antitela. Četrdeset i pet (17,4%) kontrolnih ispitanika je bilo HCMV seronegativno.

Binarna logistička regresija sa malignim oboljenjem kao zavisnom i HCMV serostatusom kao nezavisnom varijablom je pokazala 1,6 puta veću šansu za pojavu B-ćelijskog malignog oboljenja u osoba koje su HCMV seropozitivne (OR, 1,600; 95% CI, 0,682–3,753). Ipak, statistička značajnost u ovom slučaju nije uočena ( $p=0,280$ ).

Primarno poređenje je pokazalo veću prokuženost virusom kod osoba sa hematološkim malignim bolestima nego kod kontrola, mada ne značajno ( $p=0,09$ ).

Nakon mečovanja, serološki profil kontrolne grupe je izmenjen, tako da je 76 (98,7%) osoba pokazalo kontakt sa HCMV, nasuprot samo jedne osobe kod koje nije nađen dokaz o prethodnom kontaktu sa patogenom (1,3%).

Poređenje po izvršenoj statističkoj korekciji pokazalo je značajno češće prisustvo anti-HCMV IgG antitela u grupi kontrolnih ispitanika ( $p=0,035$ ; Tabela 10).

Binarna logistička regresija sa malignom bolešću kao zavisnom i HCMV serostatusom kao nezavisnom varijablom, nakon mečovanja, pokazuje da osobe prokužene ovim virusom oko 7 puta češće imaju B-ćelijsko maligno oboljenje u odnosu na seronegativne osobe (OR, 0,067; 95% CI, 0,016–1,150); utvrđena razlika je bila bliska značajnosti ( $p=0,067$ ).

### ***4.2.3. HCMV seropozitivnost kod bolesnika sa hematološkim malignim bolestima širom sveta***

Nakon statističkog slaganja na osnovu godina i pola prisustvo HCMV otkriveno je značajno češće u kontrolnoj grupi ispitanika nego kod osoba sa B-ćelijskim malignim bolestima ( $p=0,035$ ). Došavši do ovog podatka, pokušali smo da utvrdimo da li se ova pojava javlja i u sličnim bolesničkim kohortama širom sveta kada se uporede učestalost B-ćelijskih malignih bolesti i prokuženost HCMV.

Incidencije izabranih B-limfoidnih neoplazija su pokazale statistički visoko značajnu, ali inverznu korelaciju sa HCMV seroprevalencijom u 74 zemlje širom sveta. Ovi podaci su prikazani na Slici 12.

Podaci o serologiji u alogeno transplantiranih bolesnika sa isključivo B-ćelijskim malignim bolestima su preuzeti ili ekstrapolirani iz svih publikacija gde je to bilo moguće. Ovakve mogućnosti su se, međutim, pružale retko. Korišćeni su i podaci iz studija koje su obuhvatale različite tipove malignih oboljenja, iako se iz njih nije mogao dobiti podatak o HCMV serostatusu striktno u osoba sa B-ćelijskim neoplazijama.

Takođe, uključene su i pojedine grupe bolesnika sa mijeloidnim neoplazijama. Jasna podela na oboljenja porekla B- ili T-ćelijskih linija nije bila moguća. Iako distinkcija između serostatusa po pojedinačnim oboljenjima nije mogla biti postignuta, kohorte sa različitim malignim bolestima su često imale manju prokuženost HCMV-om nego odgovarajuće zdrave populacije (Tabela 22).

**Tabela 22.** Pregled distribucije HCMV seropozitivnosti širom sveta u kohortama bolesnika sa hematološkim neoplazijama nasuprot prevalencijama detektovanim u populacijama zdravih osoba ili donora krvi i/ili organa.

Kontinent, država i region (redosled od zapada ka istoku)	Hematološka maligna bolest	HCMV seropozitivnost			Oblik transplantacije i odgovarajuća terapija	Reference
		Bolesnici N, (%) (ukoliko nije naznačeno suprotno)	Donori krvi/organa, mean (27)	Opšta populacija, mean (27)		
<b>Severna i Južna Amerika</b>						
SAD, Boston, Njujork, Vašington	ALL	1 359 (48%)	0,67	0,64	Alogena TMČH, GvHD profilaksa	Kollman <i>et al.</i> 2001 [131]
SAD, Sijetl	AL, NHL, HD, MM, CLL	835 (49%)	0,67	0,64	Alogena TMČH, GvHD profilaksa	Nichols <i>et al.</i> 2002 [132]
SAD, Arkanzas	MM, HD	107 (57%)	0,67	0,64	Autologna TMČH, BCNU, BEAM, samo melfalan	Fassas <i>et al.</i> 2001 [174]
SAD, Teksas	ALL, CLL, NHL	680 (52,4%)	0,67	0,64	Hemo-radijaciona terapija	Nguyen <i>et al.</i> 2001 [175]
SAD, Holandija, 105 transpl. centara	ALL	952 (47,5%)	0,63	0,60	Alogena TMČH, GvHD profilaksa	Lee <i>et al.</i> 2007 [176]
SAD, Kalifornija	AL (deca)	144 (55,7%)	0,67	0,64	Alogena TMČH, GvHD profilaksa	Behrendt <i>et al.</i> 2009 [177]
Brazil, Bahia State	Hematološke maligne bolesti	470 (89,4%)	0,91	0,89	N/A	De Matos <i>et al.</i> 2011 [120]

Brazil, Campinas	ALL, MM, HD, NHL,	20 (82,5%)	0,91	0,89	Alogena TMČH, GvHD profilaksa	Dieamant <i>et al.</i> 2011 [81]
Čile, Santjago	Hematološke maligne bolesti	N/A (86%)	0,91	0,89	TMČH, GvHD profilaksa	Ferrés <i>et al.</i> 2012 [178]
<b>Amerika-Evropa</b>						
Kanada, SAD, UK, Francuska (33 zemlje)	ALL (B- i T-ćelijska)	564 (59,7%)	0,55	0,51		Duval <i>et al.</i> 2010 [179]
Kanada, SAD, UK, Saudijska Arabija, Holandija (CIBMTR), ~200 transpl. centara	ALL (B- i T-ćelijska)	1 883 (59,7%)	0,62	0,59	Alogena TMČH, GvHD profilaksa	Teira <i>et al.</i> 2016 [114]
46 transpl. centara	ALL (B- i T-ćelijska)	127 (47%)	0,63	0,58	MUD-BMT	Cornelissen <i>et al.</i> 2001 [180]
46 transpl. centara (20 zemalja)	ALL, NHL, MM, CLL	165 (60% donori)	0,66	0,68	Alogena TMČH	Marty <i>et al.</i> 2017 [181]
<b>Evropa</b>						
Irska, Dablin	Hematološke maligne bolesti	72 (48%)	0,43	0,39	Alogena TMČH (43) Hemioterapija (28)	Fleming <i>et al.</i> 2010 [182]
Švedska i Italija, Getenburg i Rim	AML	81 (70%)	0,74	0,71	Hemo-radioterapija	Bernson <i>et al.</i> [129]
Švedska, Nemačka, Holandija, Italija, Francuska	ALL (B- & T-ćelijska)	3 539 (55%)	0,62	0,58	Alogena transplantacija	Ljungman <i>et al.</i> 2003 [183]

Centri članice EBMT	ALL, AML, HD, NHL	40 306 (53,9%)	0,62	0,58	Alogena i autologna TMČH	Ljungman & Brand 2007 [128]
Švedska, Španija, UK, Francuska, Italija, Holandija, Poljska, Nemačka	ALL, LY	31 669 (59,8%)	0,62	0,58	Alogena TMČH	Ljungman <i>et al.</i> 2014 [184]
48 transpl. centara (Evropa, MENA, Južna Afrika)	ALL, NHL, HD	165 (81,4%)	0,77	0,75	Alogena transplantacija	Ljungman <i>et al.</i> 2002 [185]
SAD (CIBMTR), Kanada, UK, Španija, Švedska, Saudijska Arabija, Novi Zeland, Japan	ALL dečijeg doba (B- & T-ćelijska)	980 (53%)	0,69	0,65	MRD, URD, UCBT...	Mehta <i>et al.</i> 2019 [186]
Francuska, SAD, UK, Nemačka, Češka, Izrael	AML (>50 godina)	3 398 (65%)	0,60		MUD TMČH	Rubio <i>et al.</i> 2016 [187]
11 evropskih zemalja, Izrael i Turska	Dečija B-prekursorska ALL	140 (41%)	0,63	0,65	Alogena TMČH	Dalle <i>et al.</i> 2018 [188]

Francuska, Izrael, Španija, Nemačka, Belgija, Holandija, UK, Poljska (EBMT)	B-ALL (>60 godina)	126 (59,3%)	0,61	0,57	RIC Alogena TMČH	Roth-Guepin <i>et al.</i> 2017 [189]
Belgija, Brisel	9 dece, 7 odraslih	16 (35%)	0,56	0,52	Alogena TMČH	Debaugnies <i>et al.</i> [190]
Danska, Kopenhagen	ALL dečijeg doba & odrasli	118 (54%)	0,60	n,a,	Alogena TMČH	Kielsen <i>et al.</i> 2018 [191]
Holandija, Utrecht	ALL, NHL, HD	101 (50,6%)	0,57	0,53	Allogena transplantacija	Meijer <i>et al.</i> 2002 [192]
Holandija, Rotterdam	ALL, NHL, MM	47 (66%)	0,57	0,53	Alogena TMČH	Broers <i>et al.</i> 2000 [193]
Poljska, Vroclav	ALL, LY	26 (78%)	0,7	0,66	TMČH	Jaskula <i>et al.</i> 2015 [194]
Češka, Brno	ALL dečijeg i adolescentskog doba, NHL, HD	104 (37,6%)	n.m.	0,42	Konvencionalna hemioterapija	Michálek & Horvath 2002 [195]
Nemačka, Rusija, Hamburg, Sankt Petersburg	ALL, NHL	54 (39%)	0,62	0,57	Alogena TMČH	Kröger <i>et al.</i> 2001 [196]
Rusija, Moskva	AML, Mantle-cell limfom	183 (45,9%)	0,74	0,7	Alogena TMČH	Vdovin <i>et al.</i> 2016 [197]
Hrvatska, Zagreb	ALL, NHL, MM, HD, CLL	47 (77%)	0,83	0,8	Alogena TMČH	Peric <i>et al.</i> 2018 [198]

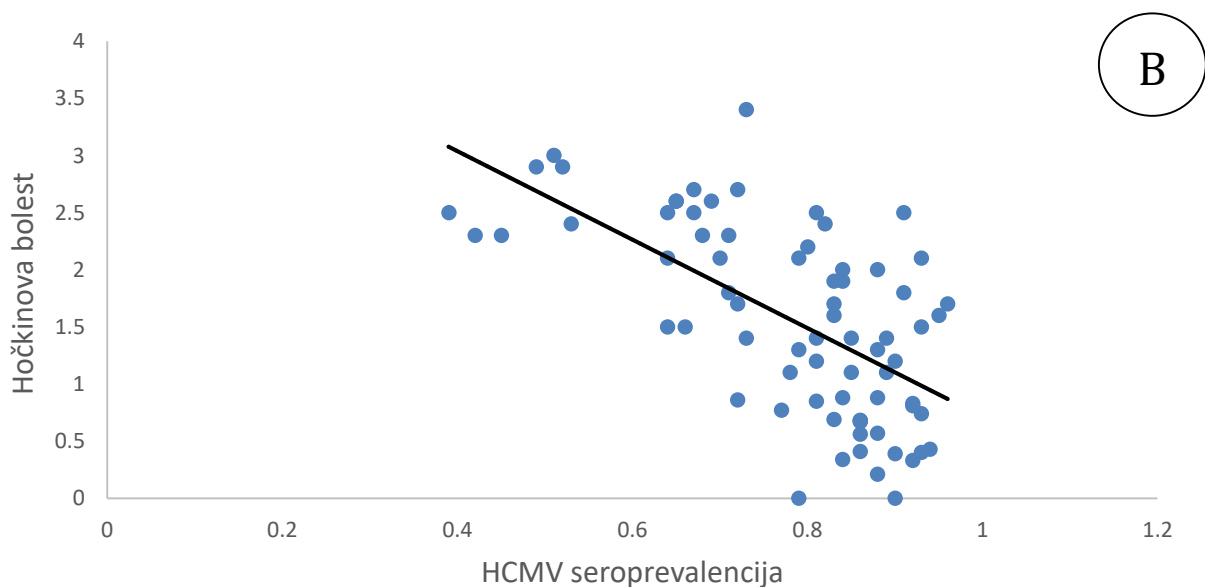
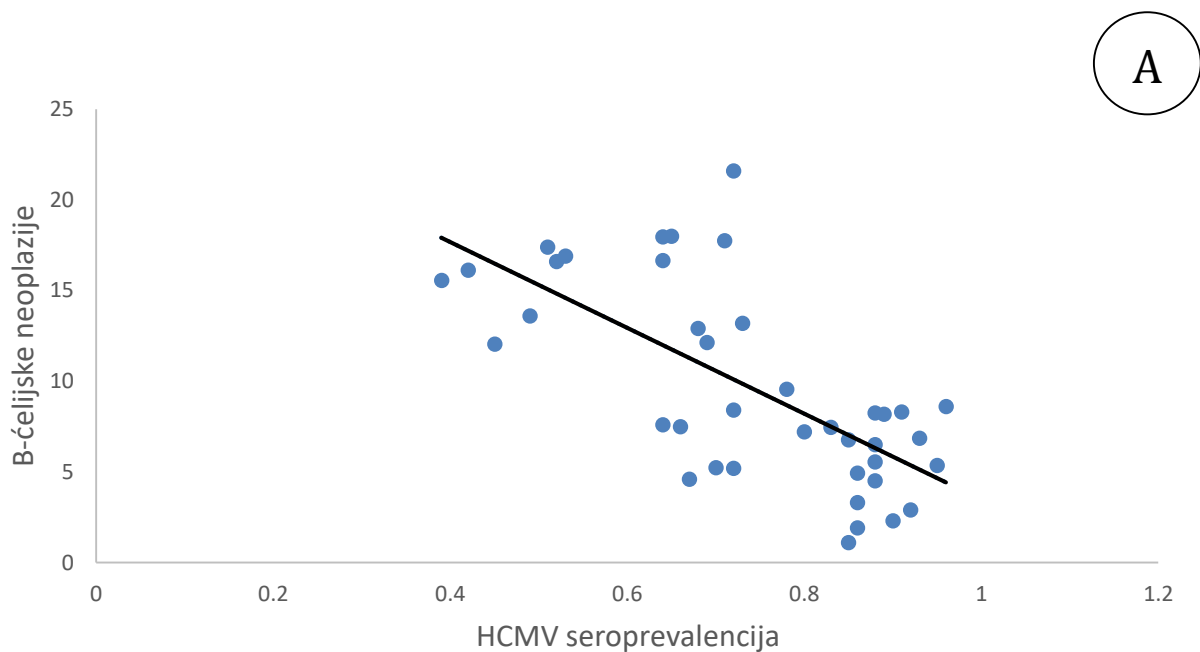
Mađarska, Segedin	LY	224 (75%)	0,87	0,84	Autologna TMČH Hemioterapija	Piukovics et al. 2017 [130]
Italija, Rim	AML	52 (93%)	0,76	0,73	Chemoradio therapy	Capria et al. 2010 [123]
Italija, Rim	LY	327 (93%)	0,76	0,73	Autologna transplantacija	Marchesi et al. 2015 [122]
Italija, Milan, Udine, Bergamo, Ankona, Alesandria	B-ćelijski limfom	265 (70%)	0,76	0,73	Alogena TMČH	Mariotti et al. 2014 [199]
Nemačka, Francuska, Finska	ALL (B- & T- ćelijski)	5 158 (60%)	0,58	0,54	Alogena TMČH	Schmidt- Hieber et al. 2013 [200]
Srbija	ALL, HD, WD, CLL, MM,	83 (88%)	N/A	0,9	Alogena TMČH, Hemo-radioterapija	Ovo istraživanje
Španija, Barselona	AL, NHL, CLL, MM, HD/ST	150 (66%)	0,72	0,69	Alogena TMČH- RIC GvHD profilaksa	Piñana et al. 2010 [201]
<b>Bliski Istok i Severna Afrika</b>						
Saudijska Arabija, Džeda	ALL, NHL, HD, MM, CLL	1 252 (95,76%)	0,89	0,88	Hemioterapija TMČH	Zaidi ARZ et al. 2019 [124]
Saudijska Arabija, Jordan, Rijad, Irbid	ALL (deca)	82 (1,22%)	0,85	0,87	Alogena TMČH UCBT GvHD profilaksa	Al-Sweedan et al. 2017 [202]
Saudijska Arabija, Rijad	AL (deca)	73 (68%)	0,89	0,88	Allo-pupčana vrpca TMČH	Al-Hajjar et al. 2011 [203]

Jordan, Aman	AL (deca)	72 (31%)	0,83	0,85	Auto-TMČH	Hussein <i>et al.</i> 2015 [204] & Al Mana <i>et al.</i> 2019 [205]
Izrael, Tel Aviv, Petah Tikva	AL, LY	121 (61%)	0,75	0,72	Alogena TMČH GvHD profilaksa	Cohen <i>et al.</i> 2015 [206]
Iran, Teheran, Rašt	ALL, AML, NHL, MM & razne bolesti	126 (97,6%)	0,96	0,95	Alogena TMČH GvHD profilaksa	Valadkhani <i>et al.</i> 2016 [102]
Iran, Mashhad	Dobrovoljni davaoci krvi	1 000 (99,2%)	0,96	0,95	N/A	Safabakhsh <i>et al.</i> 2013 [207]
Iran, Urmia	Terminalna bolest bubrega (imunodeficijencija)	65 (77,4%)	0,96	0,95	Pre-transplantaciona hemodijaliza	Sepehrvand <i>et al.</i> 2010 [208]
Iran, Širaz, Teheran	Leukemia	6 (100%)	0,96	0,95	Alogena transplantacija	Behzad-Behbahani <i>et al.</i> 2004 [209]
Iran, Teheran, Širaz	AML, Talasemija, CML, AA, ALL	26 (100%)	0,96	0,95	Transplantacija koštane srži	Ziyaeyan <i>et al.</i> 2006 [210]
Tunis, Sus, Sfaks	ALL	39 (90%)	0,94	0,93	Hemioterapija	Handous <i>et al.</i> 2020 [211]
Egipat, Aleksandria	Dobrovoljni davaoci krvi	88 (96,6%)	0,94	0,93	N/A	Gawad <i>et al.</i> 2016 [212]
Egipat, Kairo	AML & ALL	28 (39%, active CMV)	0,94	0,93	Transplantacija koštane srži	Zekri <i>et al.</i> 2004 [213]

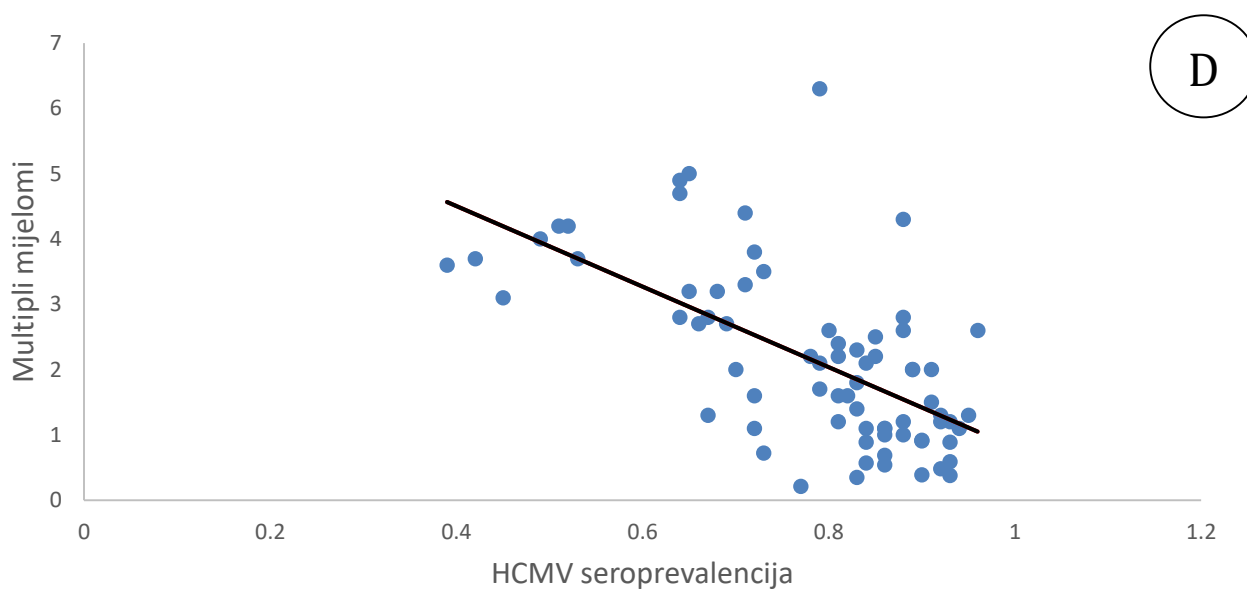
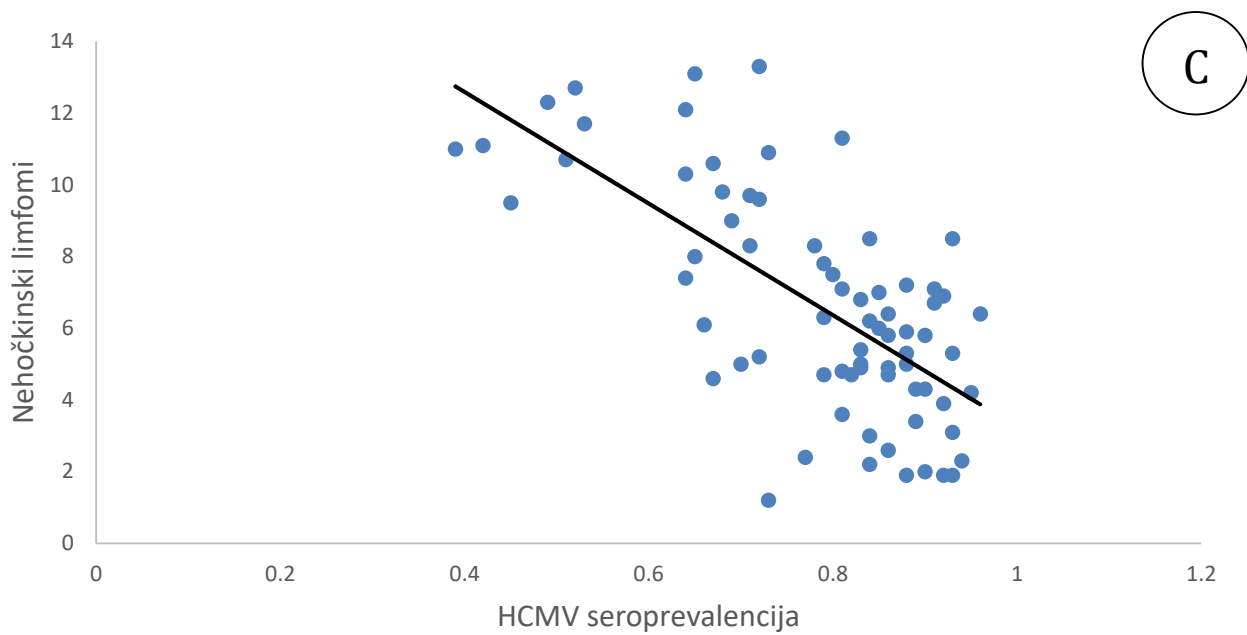
Egipat, Kairo	B-ALL (40) T-ALL (10) (deca i adolescenti)	40 (36% CMV DNA/serum)	30 (46,7% CMV DNA control)	0,93	Consolidation Tx Salvage Tx	Loutfy <i>et al.</i> 2017 [214]
<b>Australija, Indija</b>						
Australija, Viktorija	AL, B-NHL, HD, CLL, MM	28 (88%)	0,69	0,65	Hemioterapija Autologna TMČH	Ng <i>et al.</i> 2005 [121]
Australija, Sidnej	ALL, NHL, MM	103 (63%)	0,69	0,65	Alogena TMČH, MUD-TMČH	George <i>et al.</i> 2010 [84]
Indija, Velor	Maligne i nemaligne bolesti Bolesici: Donori:	463 (97,4)	0,88 403 (84,8%)	0,86	Alogena TMČH	Devasia <i>et al.</i> 2018 [215]
<b>Istočna Azija</b>						
Malezija, Australija. Kuala Lumpur, Melburn	ALL N=71, AML N=6.	77 (73%)	0,78	0,75	Hemo-radioterapija	Azanan <i>et al.</i> 2016 [216]
Kina, Guangzhou provincija	B-ALL, B-NHL	156 (86%)	0,92	0,9	Alogena TMČH	Xuan <i>et al.</i> 2012 [125]
Kina, Peking	ALL, CML, MDS, AA, NHL	60 (87%)	0,92	0,9	Alogena TMČH	Du <i>et al.</i> 2007 [217]
Tajvan, Kaohsiung, Tajpej	AL, NHL	117 (91,8%)	0,95	0,93	Alogena TMČH	Liu <i>et al.</i> 2012 [126]
Japan, Tokio	AL dečijeg doba	184 (81%)	0,76	0,72	UCBT	Tomonari <i>et al.</i> 2008 [127]
Japan, Fukuoka	ALL dečijeg doba	101 (72%)	0,76	0,72	Alogena TMČH	Inagaki <i>et al.</i> 2015 [38]

N/A – nije pronađen podatak.





**Slika 12.1.** Na graficima je prikazan odnos između HCMV seroprevalencije iz 74 države i procenjenih stopa incidencije A) B-ćelijskih neoplazija i B) Hoćkinove bolesti za 2020. godinu, standardizovanih u odnosu na starost. Odnos je obrnuto proporcionalan i statistički znaćajan za svaki ispitivani tip B-limfoidne neoplazije ( $p < 0,001$ ; Spirmanov koeficijent  $\rho_A = -0,625$  i  $\rho_B = -0,618$ ).



**Slika 12.2.** Na graficima je prikazan odnos između HCMV seroprevalencije iz 74 države i procenjenih stopa incidencije C) nehočinskog limfoma i D) multiplog mijeloma za 2020. godinu, standardizovanih u odnosu na starost. Odnos je obrnuto proporcionalan i statistički značajan za svaki ispitivani tip B-limfoidne neoplazije ( $p < 0,001$ ; Spirmanov koeficijent  $\rho_C = -0,617$  i  $\rho_D = -0,633$ ).

# Diskusija

---

Istraživanje sprovedeno doktorskom tezom je prva prospektivna studija u grupi dece kod koje je urađena alogena TMČH i koja su praćena za prisustvo HCMV infekcije u Srbiji. Takođe, ovo je jedino istraživanje koje ispituje odnos HCMV infekcije i kliničkih manifestacija u odraslih i dece u našoj zemlji. Konačno, ispitivanja vezana za potencijalni onkogeni kapacitet HCMV infekcije u odraslih sa B-ćelijskim malignim bolestima širom sveta su prva istraživanja tog tipa.

U ovom istraživanju incidencija HCMV infekcije u kohorti pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze je bila 57,1%.

Podaci dobijeni širom sveta pokazuju da se HCMV infekcija u dece kreće između 24% do 60,6% [38, 75-78]. Nešto višu incidenciju od 60,6% i 58%, ali i dalje veoma sličnu onoj dobijenoj u našoj studiji navode *Dieamant* i saradnici kao i *Gaziev* i saradnici, respektivno [75, 79].

Kod dece kod koje je urađena autologna TMČH nije dokazano prisustvo HCMV infekcije. Iako je istraživanjem obuhvaćeno samo 9 pedijatrijskih ispitanika koji je urađen ovakav oblik transplantacije, ovo nije neočekivan podatak. Infekcija HCMV se značajno ređe javlja u osoba kod kojih je urađena autologna TMČH.

Iz ovih razloga, znatno veća učestalost HCMV infekcije se dijagnostikuje u drugoj grupi pedijatrijskih bolesnika koju sačinjavaju isključivo ispitanici kod kojih je bila urađena alogena TMČH. Kod ovih bolesnika incidencija pojave virusne DNK u uzorku je bila 71,9%.

Sličan podatak se može pronaći u istraživanju *Bonon* i saradnika [80] koji navode učestalost od 68% kod bolesnika kod kojih je urađena TMČH u Brazilu (*Campinas*). Uporedivu incidenciju od 78% prijavljuju *Dieamant* i saradnici [81] u grupi bolesnika sa malignim i nemalignim osnovnim bolestima (*Campinas*, Brazil). Razlika između ispitivanih kohorti ipak postoji, jer je u tom istraživanju obuhvaćena kako pedijatrijska, tako i adultna populacija. Alternativno, u grupi koja se sastojala isključivo od dece, isti autor navodi niži procenat (60,6%) bolesnika sa HCMV infekcijom [75].

Niže incidencije se mogu naći u grupama pedijatrijskih ispitanika iz Sjedinjenih Američkih Država (Atlanta, Džordžija) [77] i Čilea (Santjago) [78], gde je virusna DNK detektovana u približno jednoj trećini i jednoj četvrtini bolesnika, respektivno. Učestalost HCMV infekcije je takođe manja u kohorti dece iz Japana (Fukuoka) [38], dok drastično niže vrednosti (24%) srećemo u radu *Yoon* i saradnika (Seul, Južna Koreja) [76].

Podaci iz kohorti koje se sastoje isključivo ili pretežno od odraslih bolesnika takođe pokrivaju širok spektar incidencija. Viša učestalost HCMV viremije (84,3%, Fukuoka, Japan) je primećena kod bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH kao terapija izbora zbog raznih hematoloških poremećaja [82]. S druge strane, niže učestalosti su objavljene u istraživanjima iz Ujedinjenog Kraljevstva [83] i Australije [84], gde se HCMV infekcija sreće u oko 50% i 39,1% slučajeva.

Širok spektar učestalosti virusnih reaktivacija može biti posledica razlika u ispitivanim bolesničkim populacijama. Ove grupe se razlikuju po broju ispitanika, dužini praćenja pojave HCMV infekcije, osnovnom oboljenju, terapijskom režimu kao i obliku transplantacije koji je primenjen (alogeni *vs* autologna TMČH). Još jedan od razloga koji bi mogao dovesti do ove pojave jeste i metoda kojom je HCMV infekcija detektovana. S obzirom na to da je poznato da test antigenemije može dati različite rezultate od PCR-a [85], istraživanje u kojem je on korišćen može dovesti do drugačijih zaključaka.

Geni *UL55* i *UL73* kodiraju površinske glikoproteine B i N koji imaju značajne uloge u patogenezi HCMV infekcije. Molekul gB predstavlja površinski transmembranski protein ključan u infekciji ćelija domaćina i u širenju virusa između ćelija. On je takođe ciljna struktura za neutrališuća antitela, te glavna komponenta eksperimentalnih HCMV vakcina danas [86]. Glikoprotein N je veoma varijabilan molekul, sa važnom ulogom u virusnoj replikaciji, izuzetno polimorfan na aminokiselinskom nivou i predstavlja metu neutrališućih antitela [87].

Najčešće detektovani genotipovi u studiji sprovedenoj u populaciji dece kod koje je urađena TMČH su bili gB4 (38,9%) i gN1 (34,6%).

Za *UL55* gen, druge i treće po učestalosti su bile gB1 i gB2 genotipske varijante, sa po 27,8% i 22,2%. Najređi gB genotip je bio gB3 (11,1%). Peti genotip glikoproteina B nije detektovan.

Na lokusu za *UL73*, detektovano je pet gN varijanti. U uzorcima su se od gN1 genotipa ređe javljali gN3b (23,1%), gN4b/c (19,2%) i gN4a (15,4%). Prisustvo gN2 je potvrđeno u samo 7,7% slučajeva.

Podaci iz ove teze vezani za distribuciju gB genotipova nisu u potpunosti u skladu sa drugim istraživanjima u koja su bili uključeni pedijatrijski i adultni bolesnici kod kojih je urađena TMČH.

U najvećem broju drugih studija gB1 genotip je najčešća HCMV varijanta. Ovakvi podaci se navode u radovima autora iz Brazila, Meksika, Češke, Irana, Kanade i Poljske [81, 88, 36, 89-91]. Iako je u Kini najčešći genotip gB3 [92], autori su gB1 ipak detektovali sa skoro podjednakom učestalošću. Ovo ukazuje na vodeću učestalost gB1 varijante širom sveta.

Iako je varijanta gB4 je bila najprisutnija u populaciji dece u Srbiji kod koje je urađena alogena transplantacija, u drugim ispitivanjima je ovaj genotip imao najmanju učestalost.

Iz istraživanja obuhvaćenih ovom tezom se ne može izneti zaključak o distribuciji neprototipskih genotipova gB5, gB6 i gB7. Objašnjenje leži u činjenici da retko koja studija ispituje prisustvo ovih genotipova, te molekularna epidemiologija ovih glikoproteina ostaje nedovoljno istražena.

U prospektivnoj studiji *Diaemant* i saradnika [81] koja je ispitivala 63 bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH, dominantan genotip je bio gB1 (39%), sa sličnom učestalošću i gB2 genotipa (35%). Genotip gB4 je, suprotno populaciji dece iz Srbije, bio prisutan u samo 14% slučajeva, dok je gB3 bio najređe dokazivan genotip u obe studije.

U kohorti 30 dece kod koje je urađena TMČH autori iz Meksika takođe navode gB1 kao najčešće detektovan genotip u kohorti (30%), pri čemu je incidencija gB4 najniža (3%) [88]. Slični podaci su navedeni u populaciji 53 adultna bolesnika iz Češke Republike kod kojih je urađena alogena TMČH, gde je kao najprevalentniji genotip utvrđen gB1 (30%), dok je najređa varijanta bila gB4 (4%) [36]. Ovo je u suprotnosti sa podacima iz naše studije, gde je upravo genotip gB4 najprevalentniji.

*Wu* i saradnici [92] opisuju gB3 genotip kao najprisutniji (39%) u primalaca matičnih ćelija hematopoeze u Kini. Varijanta gB1 je sa sličnom učestalošću od 36%, dok je gB4

pronađen kod jednog bolesnika (1%). U 5% bolesnika je pronađen gB5, nedetektovan u našoj populaciji.

Preovladavanje gB1 genotipa je primećeno i u primalaca solidnih organa. Istraživanje sprovedeno kod 239 bolesnika kod kojih je urađena transplantacija solidnog organa je pokazalo genotip gB1 kao najprevalentniji (26%), dok se na poslednjem mestu nalazi gB4 sa 5% slučajeva [37]. U populaciji 434 primalaca bubrega iz Irana dobijeni su gotovo identični rezultati [89]. Veći procenat gB1-pozitivnih bolesnika (38%) je naveden u kohorti 50 primalaca jetre, bubrega, srca ili pluća iz Kanade, dok je gB4 ponovo najređa varijanta [90].

Dok je gB3 bio retko identifikovan genotip kod bolesnika u Srbiji, podaci iz pojedinih drugih istraživanja su pokazali suprotno [90, 92]. Primetna je razlika između azijskih (bliskoistočnih i dalekoistočnih) HCMV genotipskih profila u odnosu na konstelaciju varijanti dijagnostikovanih u zemljama sa višim socioekonomskim statusom. Slične podatke o većoj učestalosti gB genotipa daju *Coquette* i saradnici [39], u čijoj grupi ispitanika je gB3 drugi najčešći genotip (23,7%), sa sličnom zastupljenošću kao i najprisutniji gB1 (28,9%). Pomenuta studija se razlikuje od do sada navedenih po tome što su deo kohorte sačinjavali i bolesnici koji, iako imunosuprimirani, nisu primaoci transplantiranih organa.

U radu koji ispituje HCMV infekciju kod bolesnika iz Krakova (Poljska) testiranje PCR-om je rađeno na 4 genotipa (gB1-4), pri čemu je najprevalentniji bio gB1. Na kraju perioda praćenja, gB1 je bio registrovan u 66,7% bolesnika, dok su gB3 (33,3%) i gB4 (26,7%) bili drugi i treći najčešće detektovan genotip. Najređe opisana varijanta u ovoj kohorti bolesnika je bila gB2 [91].

U studiji kanadskih naučnika koji su ispitivali uzorke bolesnika sa transplantiranim solidnim organom, autori su detektovali prva četiri gB genotipa, pri čemu se kao najčešći manifestovao gB1 (50,4%) [93]. Varijante gB2, gB3 i gB4 su bile prisutne u 21%, 9,1% i 2,5% uzoraka, respektivno.

U vreme sprovođenja istraživanja, naša studija je bila prva koja je dala podatke o gN genotipovima u pedijatrijskih kod bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH. Jedini pronađeni podaci za gN genotip su bili vezani za adultne populacije. *Xia* i saradnici su u prospektivnom istraživanju naveli gN3a kao najprevalentniji genotip u 102 odrasle osobe kod koje je urađena TMČH u Kini [94]. Varijanta gN4c je bila dominantna u kohorti 40 primalaca solidnog organa [95].

Poreklo razlika u distribuciji HCMV genotipova uočenih širom sveta još uvek nije rasvetljeno. Moguće je da je ovakva raspodela virusnih varijanti posledica varijacije u demografskoj alokaciji samih genotipova i kompleksnih mehanizama patogeneze i uzroka imunosupresije [89].

U ovom istraživanju, 25% bolesnika kod kojih je urađena TMČH su imali infekciju izazvanu prisustvom više od jednog HCMV gB i/ili gN genotipa, takozvanu mešanu infekciju. U tri slučaja (12,5%) je registrovana infekcija sa više od jednog gB genotipa, dok je veći broj gN varijanti opisan u 16,7% bolesnika. Ovo je u skladu sa istraživanjem sprovedenim nad kohortom meksičkih pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH, gde procenat osoba sa mešanom HCMV infekcijom iznosi 27% [88]. Važno je napomenuti da je ta studija uključila samo slučajeve gB mešane infekcije. Poredeći samo ovaj genotip naša kohorta je imala oko dvostruko manje infekcija sa više od jedne gB varijante. Niže vrednosti su navedene u studijama iz Brazila [81] i Kine [92], gde se infekcija sa više genotipova sreće u 6% i 16,8%, respektivno. Još jednom, u pomenutim istraživanjima praćen je samo gB genotip. Bitno je naglasiti da je uzorak bolesnika sa mešanim infekcijama bio veoma mali u studiji *Dieamant* i saradnika, te je procenat neophodno uzeti sa rezervom.

Veći broj slučajeva HCMV infekcije sa najmanje dva gB genotipa je primećen i kod primalaca solidnog organa [90]. U studiji *Sarcinella* i saradnika [40], 6,9% bolesnika je imalo mešanu HCMV infekciju, što je skoro dvostruko manje od gB genotipova u našoj studiji. U grupi bolesnika koji su primili imunosupresivnu terapiju, od kojih je kod jednog dela urađena alogena TMČH, analize su u čak 25,8% slučajeva ukazale na prisustvo više od jednog HCMV genotipa [39].

*Zawilinska* i saradnici [91] opisuju prisustvo multiplih genotipova u 40% od 30 ispitivanih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH. U radu Panga i saradnika [93] multipli genotipovi su detektovani u 17% uzoraka bolesnika sa transplantacijom solidnog organa.

Znatne varijacije u odnosu na procenat bolesnika inficiranih sa više od jednog genotipa mogu biti posledica veličine ispitivane kohorte. Neke od studija su imale veoma mali broj ispitanika, što može značajno uticati na procenat HCMV mešanih infekcija u toj populaciji. Metod detekcije HCMV takođe može imati uticaja – virus je u uzorcima tražen različitim metodama od kojih svaka ima drugačiju mogućnost otkrivanja samog patogena u uzorku. Takođe, faktori koji utiču na distribuciju genotipova mogu imati posledice po rezultate istraživanja.

Humani citomegalovirus može izazvati teške infekcije kod bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH. Neke od manifestacija HCMV infekcije jesu gastrointestinalna bolest, hepatitis, encefalitis, retinitis, HCMV bolest kasnog početka itd. S druge strane, opisani su i indirektni efekti ovog patogena kod osoba kod kojih je urađena TMČH, kao što su pojava oportunističkih bakterijskih i gljivičnih infekcije, ali i povećan mortalitet.

U našem istraživanju, u grupi bolesnika kod kojih je urađena alogena ili autologna TMČH, HCMV infekcija je bila značajno povezana sa GvHD. Ostale komplikacije u toku lečenja kao što su mukozitis, febrilna neutropenija, sepsa, VOD, pneumonija i hemoragijski cistitis nisu korelirale sa HCMV infekcijom.

Infekcija HCMV i GvHD su značajne komplikacije nakon alogene TMČH i pokazuju jasnu međusobnu vezu. Više istraživanja je ukazalo na to da GVHD i terapija za ovu komplikaciju predstavljaju rizik za pojavu replikacije HCMV [96-98]. Ova povezanost je uočena i u drugim istraživanjima koja su obuhvatila pedijatrijske kohorte. Posmatrajući 110 dece kod kojih je urađena TMČH, *Zaucha-Prazmo* i saradnici [99] su uočili pojavu GvHD u 73% bolesnika sa HCMV infekcijom detektovanom testom antigenemije.

U istraživanju koje je obuhvatilo 182 pedijatrijska bolesnika sa malignim i nemalignim oboljenjima kod kojih je učinjena TMČH, GvHD gradusi II-IV su bili povezani sa povećanim rizikom od pojave viremije [100]. Gradusi III-IV GvHD su dovedeni u vezu sa HCMV infekcijom u dece kod kojih je urađena alogena TMČH [101], dok su u drugoj studiji sa istim transplantacionim režimom i sa GvHD pedijatrijski bolesnici bili pod značajno većim rizikom za pojavu HCMV viremije [102]. *Miler* i saradnici [96] su opisali značajnu vezu između HCMV infekcije i pojave akutnog GvHD u grupi od 181 bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH. Isti zaključci o asocijaciji akutnog GvHD i HCMV infekcije dolaze iz studije *Yoon* i saradnika [76]. Recipročna uzročnost replikacije HCMV i GvHD je opisana prvi put 2010. godine [103]. U ovom istraživanju, 515 bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH je testirano na prisustvo HCMV i kod njih je registrovan akutni GvHD. Autori zaključuju da GvHD može indukovati HCMV replikaciju, ali i da sama HCMV infekcija predstavlja značajno veći rizik za razvijanje akutnog GvHD kod ovih bolesnika.

Bolest kalema-protiv-domaćina je multivarijantnom analizom takođe identifikovana kao faktor u kasnoj rekurentnoj pojavi HCMV [104]. U kohorti bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH, akutni GvHD je identifikovan kao značajan faktor rizika za pojavu

HCMV infekcije [105]. Značajna povezanost je uočena i između hroničnog GvHD i HCMV pozitivnosti od strane Inagakija i saradnika [38].

Suprotne zaključke možemo pronaći u studiji *Haastrup* i saradnika [106]. U njihovoj kohorti dece i adolescenata lečenih alogenom TMČH nije opisana značajna veza između akutnog GvHD i HCMV infekcije.

Kod bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH u našem istraživanju HCMV viremija se češće javljala kod osoba sa malignim nego sa nemalignim oboljenjem, iako bez statističke značajnosti. Ovo je u skladu sa podacima *Yoon* i saradnika [76], proisteklim iz analize kohorte pedijatrijskih bolesnika nakon alogene TMČH, gde tip osnovne bolesti (maligno *vs* nemaligno oboljenje) nije bio značajan u odnosu na prisustvo patogena u krvi.

U retrospektivnoj studiji bolesnika do 20 godina starosti veći procenat bolesnika sa HCMV infekcijom je imao malignu bolest, iako razlika između HCMV pozitivnih i negativnih nije bila značajna [101]. Do sličnih zaključaka dolaze i *Valadkhani* i saradnici [102].

Razlike u zaključcima mogu prosteći iz manjeg broja bolesnika, različite demografije u bolesničkim grupama kao i usled nedostatka konzistencije u konfiguraciji kohorta ispitanika, o čemu se u ovoj tezi diskutovalo ranije.

U istraživanju vezanom za ovu doktorsku tezu nije pronađena značajna veza između HCMV infekcije i uzrasta ili pola, iako je većina uzoraka pozitivnih na ovaj patogen detektovana u dečaka i dece starijeg uzrasta. Slični podaci se mogu pronaći u retrospektivnoj studiji dece kod koje je urađena alogena TMČH gde ovi demografski podaci nisu bili faktori rizika za pojavu HCMV infekcije [101], kao i u radu Inagakija i saradnika [38]. Naše zaključke potvrđuju i istraživanja rađena na kohorti bolesnika koja je obuhvatila i pedijatrijsku i adultnu populaciju [102], ali i u grupi odraslih bolesnika kod kojih je urađena TMČH [107]. U studiji bolesnika sa kohortom sastavljenom od dece i odraslih, u univarijantnoj analizi pol nije identifikovan kao faktor rizika za HCMV infekciju [105].

Suprotno do sada navedenom, u drugom radu *Goldsmith* i saradnika [108] koji su ispitivali haploidentičnu TMČH, viremija je uočena znatno češće u žena. Veća učestalost pojave HCMV infekcije u starijih ispitanika (prosečan uzrast 17,5 godina) je opisana u kohorti 181 bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH [96], mada razlika nije bila statistički značajna.

Značajna povezanost između starosti bolesnika i incidencije CMV dokazane testom antigenemije je pokazana univarijantnom analizom u radu *Schetelig* i saradnika [109], mada se notirana značajnost nije održala nakon multivarijantne analize. Više incidencije HCMV viremije su uočene kod osoba starijih od 60 godina [108], dok su podaci slični pomenutim opisani i kod bolesnika sa 50 ili više godina [110].

U istraživanju *Yang* i saradnika [105], nije bilo razlike u HCMV infekciji između grupe ispitanika od 34 godine ili starijih, naspram bolesnika koji su bili mlađi.

Kod kritično obolelih imunokompetentnih bolesnika u multivarijantnim modelima muški pol je bio povezan sa povećanim rizikom za reaktivaciju HCMV [111]. Starost bolesnika se nije pokazala kao relevantan faktor. Od značaja je napomenuti da su stope virusne reaktivacije u populacijama zdravih osoba značajno više u žena [112].

Veća incidencija HCMV infekcije u dece starijeg uzrasta i uopšte u starijih bolesnika može biti objašnjena i činjenicom da prokuženost ovim virusom raste sa godinama. U ovom kontekstu, za očekivati je da se virus češće susreće u populacijama sa višom seroprevalencijom. Na isti način različiti terapijski modaliteti, fluktuirajući nivoi imunosupresije i nutritivni stres [113] mogu objasniti šablone u starosnoj varijabilnosti i stopama HCMV reaktivacije. Odnos između HCMV reaktivacije i pola još uvek nije u

potpunosti rasvetljen. Na rezultate takođe može uticati različita metodologija korišćena u detekciji virusa, kako je prethodno u tekstu disertacije i objašnjeno.

U ovom istraživanju, bolesnici sa HCMV infekcijom su imali letalan ishod ređe od bolesnika kod kojih virusna DNK nije detektovana, iako ova razlika nije bila statistički značajna. Slični podaci dolaze iz studije Laberkove i saradnika [100], gde HCMV infekcija nije povezana sa lošijim ishodom.

Naši zaključci nisu u skladu sa podacima da virusna reaktivacija predisponira bolesnika za loš post-transplantacioni ishod [114]. Takođe, primaoci alogenih transplantata sa pozitivnom HCMV serologijom su pod povećanim rizikom za virusnu reaktivaciju i mortalitet nezvan za relaps [115]. U studiji rađenoj na 110 konsekutivno transplantiranih pedijatrijskih i adolescentnih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH HCMV infekcija je bila značajan faktor rizika za mortalitet vezan za transplantaciju u prvih 100 dana posle TMČH [106].

Rezultati u ovoj doktorskoj tezi koji su vezani za HCMV infekciju i ishod bolesnika se ne podudaraju sa većinom pomenutih istraživanja. Ova diskrepanca može biti posledica male kohorte bolesnika u našoj studiji, ali i različitih terapijskih modaliteta i metoda kojima je dokazivano prisustvo HCMV.

Ispitivanje sprovedeno ovom tezom je pokazalo da bolesnici sa mešanim genotipovima, kako oni sa više gB, tako i oni sa više gN varijanti, nisu imali povećan broj kopija virusne nukleinske kiseline u odnosu na ispitanike sa samo jednim prisutnim genotipom.

Ovakav zaključak je u suprotnosti sa pojedinim sprovedenim studijama koje su se ticale samo gB genotipova. Ispitujući efekat polimorfizama u *UL55* genu na kliničke i virusološke ishode HCMV bolesti u 239 bolesnika sa transplantiranim solidnim organom, Manuel i saradnici [37] su došli do zaključka da je HCMV viremija značajno viša u osoba sa mešanim infekcijama. Iako se nijedan od ispitivanih genotipova nije pokazao kao posebno virulentniji, interesantno je napomenuti i da je vreme do eradikacije virusa u ovoj grupi ispitanika bilo značajno duže.

U kohorti imunokompromitovanih bolesnika od kojih su neki bili primaoci transplantata, osobe inficirane sa više gB varijanti su razvile progresiju u HCMV bolest, imale povećanu stopu odbacivanja kalema, višu HCMV viremiju i značajno češću infekciju drugim herpesvirusima [39].

*Zawilinska* i saradnici [91] su ispitivali HCMV infekciju i polimorfizam *UL55* gena u 30 seropozitivnih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH. U 40% bolesnika infekcija je bila mešanog tipa, sa 2 ili 3 detektovana gB genotipa. Detektovana multipleks *Real-Time* PCR metodom varijanta gB1 je u mešanim infekcijama pokazivala značajno višu viremiju. U ovoj kohorti, bolesnici sa mešanim infekcijama su češće imali hronične HCMV infekcije i GvHD, dok je antivirusna terapija bila manje efikasna. Autori su neželjene efekte pripisali prisustvu gB3 i gB4 genotipova.

U uzorcima bolesnika sa transplantiranim organom, Pang, Humar i Preiskaitis su opisali značajno više viremije u krvi bolesnika sa mešanim infekcijama [93].

Ispitujući genske lokuse koji kodiraju za gN i gO genotipove, Vinuesa i saradnici [116] su pokazali trend ka višim viremijama kod bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH i dokazano prisustvo više od jedne HCMV varijante, iako razlika nije bila značajna.

Što se tiče pojedinačnih genskih varijanti, najčešći genotipovi detektovani kod bolesnika sa GvHD su bili gB1 (45,4%) i gN1 (42,1%). Uzimajući u obzir sve komplikacije (GvHD, mukozitis, febrilna neutropenija, hemoragijski cistitis, VOD i pneumoniju), najčešći



gB genotipovi su bili gB4 (36,6%) i gB1 (34,1%). Varijante *UL73* gena koje su bile najfrekventnije su gN1 (40,3%) i gN4b/c (25,8%).

Bolesnici sa mešanim genotipovima u našem istraživanju nisu pokazali značajnu vezu sa pojavom GvHD; slični podaci su dobijeni i za komplikacije kao što su mukozitis, febrilna neutropenija, sepsa, VOD i hemoragijski cistitis. Ovaj zaključak je u suprotnosti sa istraživanjem *Zawilinska* i saradnika, gde je pokazana tendencija bolenika sa mešanim infekcijama da razviju GvHD [91].

Citomegalovirusna DNK je u našoj studiji detektovana u uzorcima svih kod bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH od srodnog delimično podudarnog davaoca.

Znatno nižu incidenciju u svom radu navode *Goldsmith* i saradnici [107], gde je pronađeno 53,4% HCMV pozitivnih bolesnika (*Saint Louis*, MO, Sjedinjene Američke Države). Osobe kod kojih je urađena TMČH od srodnog delimično podudarnog davaoca su imale aktivnu virusnu infekciju u značajno više slučajeva nego bolesnici kod kojih je urađena MSD i MUD TMČH. Ovo verovatno može biti posledica većeg nivoa imunosupresije i slabijeg oporavka imunskog sistema kod bolesnika sa HID donorima. Na kohorti 144 primaoca alogene TMČH, *Yang* i saradnici [105] su pokazali da je HCMV viremija značajno povezana sa HID TMČH.

Virusna DNK u krvi je značajno ređe detektovana kod primalaca MSD transplantata (21,7%) u odnosu na druge oblike alogene TMČH. Slične rezultate dobijaju i *Jain* i saradnici [101], koji opisuju veći broj bolesnika MSD primalaca bez HCMV, nasuprot onih koji su imali nesrodne donore (*Taoyuan*, Tajvan).

U drugoj grupi bolesnika kod kojih je ispitivana kasna HCMV reaktivacija, ispitanici kod kojih je urađena MSD TMČH bez akutnog GvHD su pokazali najnižu incidenciju reaktivacije [104].

Ovo može biti objašnjeno činjenicom da bolesnici sa MSD brže oporave imunitet, što može dovesti do niže incidencije HCMV reaktivacije. Šta više, kod najvećeg broja bolesnika osnovno oboljenje je bilo maligno. Redukovane doze imunosupresivne terapije su savetovane u takvih bolesnika, očekujući da će sledstveni GvHD doprineti rezistenciji zbog efekta kalema-protiv-leukemije, što može dovesti do smanjenja virusne stope reaktivacije.

U kohorti pedijatrijskih bolesnika sa akutnom leukemijom, zapažanja su bila suprotna; u ovoj studiji tip uparivanja donora i bolesnika nije bio značajan u odnosu na frekvenciju HCMV infekcije [38]. Interesantno je napomenuti da je u ovom istraživanju manje slučajeva infekcije detektovano kod bolesnika čiji su donori rodbinski vezani za primaoca i gde je postignuto dobro HLA poklapanje.

Razlike se mogu javiti i zbog činjenice da su kohorte u različitim istraživanjima obuhvatile i decu i odrasle, dok je u istraživanju sprovedenom ovom tezom obuhvaćena samo dečija populacija.

U našem istraživanju nije uočena povezanost između različitih oblika transplantacije alogene TMČH i visine viremije u pedijatrijskih bolesnika. Bolesnici kod kojih je urađena haploidentična TMČH i MUD su, ipak, imali niže viremije, dok je suprotno primećeno za MSD kaleme.

Izostanak asocijacije između nivoa virusne DNK u krvi i oblika TMČH, ali i HLA-podudarnosti i srodnosti donora je takođe primećen u grupi bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH [117].

Rezultati našeg istraživanja su prvi podaci dobijeni prospektivnim praćenjem nivoa HCMV viremije i njegovim upoređivanjem sa kategorijama donora kalema u najmlađim primaocima alogene matične ćelije hematopoeze u Srbiji.

S obzirom na manjak podataka vezan za ovu populaciju, dalja istraživanja su potrebna kako bi se validnost naših zaključaka adekvatno proverila.

U populaciji dece kod kojih je urađena alogena TMČH, uzrast nije bitno korelirao sa brojem kopija virusne nukleinske kiseline. Nasuprot tome, pol se pokazao kao značajna varijabla u odnosu na viremiju, te su primećene više vrednosti viremije u devojčica u odnosu na dečake. Koliko nam je poznato, ovakva pojava do sada nije opisana. Etiologija ovakve razlike i dalje ostaje nejasna, te svakako zahteva dalja ispitivanja.

Podaci o odnosu uzrasta i viremije u dece kod kojih je urađena alogena TMČH nisu opisani u literaturi, mada je poznato da u zdravim populacijama broj kopija HCMV primetno raste posle 70 godine života [118].

Rezultati naše studije su pokazali da je osnovna bolest važan faktor koji utiče na razlike u broju kopija virusne DNK. Deca sa malignim bolestima su imala značajno više viremije posle transplantacije, nego bolesnici sa nemalignim oboljenjima.

Istraživanja koja proučavaju količinu virusa u odnosu na osnovnu bolest su retka. Ispitujući antigenemiju, ali ne i broj kopija virusne DNK, Habib i saradnici [119] nisu dokazali značajnu vezu između profila osnovne bolesti (maligna *vs* nemaligna) i aktivne HCMV infekcije, uzrasta i incidencije akutnog ili hroničnog GvHD.

Viša incidencija virusne infekcije kod bolesnika sa zloćudnim tumorima se može objasniti snažnijom imunosupresijom u ovoj populaciji dece; međutim, ovo objašnjenje samo po sebi najverovatnije nije dovoljno da objasni uočenu značajnost. Dodatna istraživanja su neophodna kako bi se veza u potpunosti objasnila.

Bolest kalema-protiv-domaćina je još jedna varijabla kod koje nije pokazana povezanost sa nivoom HCMV viremije. Slični rezultati su navedeni i u drugim radovima u kontekstu akutnog GvHD [117], ili pak akutnog ili hroničnog GvHD [119].

Do suprotnog zaključka su došli *Yang* i saradnici [105]. U njihovoj studiji, viši nivoi HCMV DNK su bili značajno povezani sa grupom bolesnika sa akutnim GvHD, naspram bolesnika kod kojih ovo stanje nije dijagnostikivano.

Istraživanje sprovedeno ovom doktorskom tezom je pokazalo prve rezultate na nacionalnom nivou o HCMV prokuženosti u adultnim hemato-onkološkim bolesnicima. Ovo je prva studija koja istražuje potencijalnu onkogenost HCMV u bolesničkoj kohorti B-ćelijskih malignih bolesti.

Seroprevalencija HCMV kod bolesnika sa hematološkim neoplazijama značajno varira od studije do studije. Sa 90,4% prokuženih, Srbija je među zemljama sa najvišom prevalencijom HCMV infekcije u svetu, zajedno sa Brazilom [120], Australijom [121], Italijom [122, 123], Saudijskom Arabijom [124], Kinom [125], Tajvanom [126] i Japanom [127]. Druge zemlje Evropske Unije imaju nižu prevalenciju [128], izuzimajući gorenavedenu Italiju, čija prokuženost od 93% pokazuje značajno odstupanje. Niža seroprevalencija je dobijena u multicentričnoj kohorti švedskih bolesnika (Re: Mission, NCT01347996, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), gde je 70% osoba bilo pozitivno na anti-HCMV IgG [129], kao i u studiji bolesnika sa limfoidnim i mijeloidnim neoplazijama iz Mađarske gde je seroprevalencija HCMV iznosila 75,5% [130].

Najniža učestalost HCMV infekcije je opisana u SAD [131, 132], jednom od zemalja sa najvišom incidencijom oboljenja porekla B-ćelija na svetu.

Niska seroprevalencija opisana u radu Ljungmana i Branda [128] se može objasniti nižom prosečnom starošću grupe ispitanika (prosečna starost 31 godina), imajući u vidu poznatu ko-inkrementalnu povezanost između starosti i prokuženosti HCMV [48, 51, 52]. Takođe, s obzirom na to da su bolesnici iz ove kohorte izabrani iz stanovništva razvijenih

evropskih zemalja (Švedska, Holandija, Nemačka, Italija i Francuska), visok socioekonomski status [57] takođe ide u prilog deficita HCMV infekcija u ovoj populaciji.

Distribucija vrednosti HCMV seroprevalencija u smeru zapad-istok najčešće je obrnuto srazmerna učestalostima pojave B-ćelijskih neoplazija podešenim prema starosti u najvećem broju država širom sveta.

Takođe, seroprevalencija u navodno epidemiološki nepovezanim grupacijama je niža kod bolesnika sa B-ćelijskim i drugim malignim bolestima (AML, CML) nego u dobrovoljnih davalaca krvi/organa i u opštoj populaciji [58].

Ovi podaci se slažu sa rezultatima našeg istraživanja, koji pokazuju da je značajno veći procenat HCMV infekcije detektovan u kontrolnoj grupi ispitanika nego u onkološkoj populaciji nakon statističkog podešavanja za pol i godine.

Pomenuta razlika bi mogla biti objašnjena ukoliko HCMV pruža izvesnu zaštitu protiv B-ćelijskih malignih oboljenja.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je prokuženost HCMV viša u žena nego u muškaraca [53, 54]. Ovo je takođe bio zaključak u našoj studiji, iako nije bio statistički značajan. U studijama koje su ispitivale primaoce matičnih ćelija hematopoeze i bolesnike sa B-CLL, HCMV je bio značajno zastupljeniji u žena [52, 128, 133]. U ispitanika sa raznim hematološkim poremećajima iz Brazila, HCMV seropozitivnost je bila češća u osoba ženskog pola, iako ne značajno [122]. Interesantno je pomenuti suprotan slučaj – u studiji *Dafalla* i saradnika [134], u ispitivanoj populaciji bolesnika sa leukemijom iz Sudana, muškarci su bili češće prokuženi HCMV.

Većina istraživanja koja su se bavila ispitivanjem onkogenog potencijala HCMV kod bolesnika sa hematološkim neoplazijama su rađena u pedijatrijskim populacijama. Decidan dokaz da je HCMV onkogeni agens za sada nije ponađen. Međutim, postoje izvesni dokazi koji idu u prilog ulozi HCMV u neoplazijama krvi.

Skorašnja studija je pokazala da je kongenitalna HCMV infekcija faktor rizika za B-ALL detinjstva [66]. Slično pomenutom zaključku, *Wiemels* i saradnici su identifikovali kongenitalnu HCMV infekciju kao faktor koji dovodi do povećanog rizika za pojavu hematoloških malignih bolesti detinjstva [67]. Seropozitivnost HCMV je takođe povezana sa nekim T-ćelijskim malignim oboljenjima, kutanim T-ćelijskim limfomom (CTCL) [135], *mycosis fungoides* (varijanta CTCL) [136] i angioimunoblastnim T-ćelijskim limfomom [137].

Citomegalovirus poseduje spektar karakteristika koje nagoveštavaju njegovu potencijalnu ulogu u onkogenezi.

Prvo, njegov genom je stecište brojnih gena koji učestvuju u izbegavanju imenskog odgovora, što možda ukazuje na poremećaj imunske regulacije do koje HCMV potencijalno dovodi.

Drugo, HCMV može dovesti do oštećenja hromozoma koja uzrokuju kongenitalne defekte [138]. Nasledni materijal ovog virusa nosi i dva anti-apoptotska gena.

U kongenitalnoj infekciji, replikacija HCMV u astrocitima i drugim ćelijama može povećati transkripciju p53, poznatog pro-apoptotskog molekula [138].

Poznato je dejstvo CMV u kom povećava nivo anaplazije u ćelijama raka i/ili ćelijama asociranim sa tumorom, što je osobina koja je nazvana onkomodulacija [65, 139, 140]. U istraživanju *Dey* i saradnika [141], ovaj patogen je pretpostavljen kao onkomodulirajući agens u gliomima odraslih.

Takođe, HCMV može doprineti tumorigenezi putem "hit-and-run" mehanizma [142-145]. Navodno direktno onkogeno dejstvo je pokazano u miševima inokulisanim CMV [68]. Citomegalovirusna infekcija stimuliše ekspresiju interleukina 8 (IL-8), poznatog promotera tumorske angiogeneze, u leukemijskim ćelijama i ćelijama glioma [65].

*Hermouet* i saradnici [146] su pronašli veliki procenat infekcija u kliničkim uzorcima od bolesnika sa B-ALL sa značajno višom CMV viremijom nego što je to slučaj kod multiplog mijeloma i B-CLL.

U našem istraživanju, nakon uparivanja bolesnika i kontrola na osnovu starosti i pola, pokazano je da se HCMV infekcija značajno češće javlja kod osoba bez B-ćelijskih neoplazija. Ovakav zaključak govori protiv mogućeg onkogenog potencijala HCMV u genezi limfoma ove ćelijske linije.

Postoje dokazi koji idu u prilog represije procesa transformacije u malignim ćelijama od strane CMV [68]. Ovaj virus inhibira migratorni kapacitet mezenhimnih ćelijskih linija raka dojke MDA-MB-231 i SUM1315 [147].

Ograničen ili odsutan rast tumora je opisan u miševima sa ksenograftom CMV-inficiranim HepG2 ćelijama, nasuprot nekontrolisane tumorske ekspanzije u placebo grupi miševa [148].

Rast tumora je takođe bio inhibisan posredstvom restrikcije STAT3 aktivacije, kao i aktivacijom unutrašnjeg puta apoptoze [148, 149]. Apoptoza je takođe primećena u plućnom tkivu ksenograftovanih miševa, gde su HepG2 ćelije inficirane CMV administrirane supkutano [148].

*Erlach* i saradnici [150, 151] su predložili urođeni anti-tumorski mehanizam podstaknut od strane mišjeg CMV, koji uključuje apoptozu klonalne varijante B-ćelijskog limfoma adaptirane na jetru. Infekcija mišjim CMV je imala visoko supresivan efekat na limfomske ćelije čak i u odsustvu infekcije tih ćelija, što je značajno doprinelo preživljavanju. Nestanak tumora je takođe demonstriran u drugom istraživanju na modelu mišjeg melanoma, nakon što je CMV inokulisan u rastuću neoplaziju [152]. Ovi podaci ukazuju na pojavu apoptoze kako na mestu CMV infekcije i/ili inokulacije, tako i u udaljenim organima.

Inhibišući efekat glikoproteina B na migraciju ćelija raka dojke je skoro dokumentovan od strane *Yanga* i saradnika [153].

Pretpostavljeni anti-tumorski efekti HCMV infekcije su takođe indirektno podržani pojavom nižih stopa relapsa bolesti za akutnu leukemiju i nehoćinski limfom kod bolesnika sa HCMV reaktivacijom rano nakon alogene TMČH [38, 154-157]. Promene u imunskom sistemu izazvane ovim patogenom govore u prilog postojanja mogućeg virus-protiv-leukemije fenomena [158], analognog kalem-protiv-leukemije efektu u B-CLL [159].

U studiji koja je istraživala prisustvo HCMV u Gatrijevim karticama, ispitanici koji su bili pozitivni nisu razvili B-ALL češće kasnije u životu [160]. *MacKenzie* i saradnici [161] su vršili detekciju više herpesvirusa u osobama sa common ALL i kontrolnim ispitanicima, ali nisu decidno zaključili da je neki od ovih patogena etiološki agens u B-ALL.

Između zemalja zapadu i onih na istoku postoji upadljiva razlika u godišnjim incidencijama limfoidnih malignih bolesti [162, 163]. Istraživanje sprovedeno ovom doktorskom disertacijom je prvo u kom se skreće pažnja na inverznu asocijaciju između incidencija B-ćelijskih neoplazija i HCMV seropozitivnosti u svetu. Kako se prokuženost različitih populacija ovim patogenom smanjuje, odgovarajuće godišnje incidencije B-ćelijskih bolesti najčešće rastu. Incidencija limfoidnih neoplazmi raste decenijama širom sveta – moguće objašnjenje za ovakav porast leži u postepenom, ali globalnom padu HCMV seroprevalencija, koje je posledica postepenog poboljšanja ekonomskog statusa, zdravstvenog prosvetavanja i povećanog pristupa modernim zdravstvenim kapacitetima. Takođe, socioekonomski status je jedna od važnih varijabli u vezi sa rasnom/etničkom pozadinom [164, 165].

Razlika u incidenciji B-ćelijskih malignih oboljenja između SAD i Japana iznosi 2,5-5 puta. Najveća razlika između ove dve države bila je u procentu bolesnika sa B-CLL, 24,1% i 3,2% u SAD i Japanu, respektivno [164]. Hoćkinova bolest i nehoćkinski limfom su manifestovali najveću razliku u godišnjim incidencama između SAD i zemalja sa istoka Azije. Smanjenje i povećanje socioekonomskog statusa korelira sa trendovima incidencija limfoidnih poremećaja (Hoćkinova bolest, B-NHL, B-ALL, B-CLL i plazma-ćelijski mijelom) standardizovanih na osnovu starosti. Upravo je socioekonomski status usko povezan sa HCMV na epidemiološkom nivou. Primera radi, seroprevalencija HCMV u trudnica u Japanu (prefektura *Ishikawa*) se smanjila sa 93,2% na 66,7% između 1980. i 1998. godine [166]; ovde je bitno navesti da se incidencija limfoidnih malignih bolesti standardizovana na osnovu starosti značajno povećala, nasuprot promeni u SAD (+2,4% Japan i +0,1% Sjedinjene Američke Države) [167]. Ovo možda može biti posledica rastućeg socioekonomskog statusa u Japanu.

Oslanjajući se na svetske izveštaje o opterećenju bolestima, primetili smo inverznu korelaciju između ukupnih procena HCMV seropozitivnosti i aproksimativnih populacionih incidencija B-ćelijskih neoplazija, standardizovanih na osnovu starosti.

Prokuženost HCMV opada kako socioekonomski status raste, a bogatstvo se povećava u društvenim slojevima. Posledica ovakve promene jeste i smanjen sociodemografski rizik za primoinfekciju ovim patogenom, te moguće sledstveno povećanje rizika za nastanak B-ćelijske maligne bolesti. Suprotno, život u lošijem ekonomskom miljeu sa visokom HCMV prevalencijom možda pruža izvesnu zaštitu protiv B-limfoproliferativnih bolesti. Uopšteno gledajući, smanjenje HCMV infekcija u populaciji izgleda da dovodi do povećanja incidencije B-ćelijskih neoplazija. Tako, gde god dođe do pada pretpostavljenog protektivnog efekta HCMV usled smanjenja seroprevalencije ovog virusa, stopa malignih tumora porekla B-ćelija deluje da raste.

Podaci dobijeni istraživanjem vezanim za ovu tezu su suprotsavljani teoriji HCMV kao kofaktora u malignoj transformaciji ćelija u koja leži osnovi B-ćelijske onkopatologije.

I pored dokaza koji su pruženi u ovoj doktorskoj tezi, postoji nekoliko nedostataka u našem istraživanju na koje se treba osvrnuti. Prvo, u pitanju je retrospektivno istraživanje. Verujemo da bi prospektivna studija koja prati osobe izložene HCMV, kao i kontrolnu grupu u kojoj ne dolazi do prokuženosti ovim virusom, mogla bolje da prosudi o potencijalnom onkogenom ili protektivnom efektu HCMV.

Takođe, veći uzorak ispitanika od onog obuhvaćenog ovom tezom bi dao preciznije rezultate. S obzirom na način na koji su formirane kohorte bolesnika u studijama širom sveta, podaci vezani za procenat B-ćelijskih neoplazija se moraju smatrati aproksimativnim.

Dalje, kod bolesnika sa B-ćelijskim malignim bolestima administracija krvi i plazma derivata nije retkost, čak i pre započinjanja terapije. Samim time, prisustvo anti-HCMV IgG antitela od davalaca krvi se ne može u potpunosti isključiti. Ipak, važno je napomenuti da se ovaj nedostatak donekle umanjuje činjenicom da je i pored transfuzija kohorta bolesnika sa ovim neoplazijama u našem istraživanju imala nižu vrednost HCMV seroprevalencije od kontrolne grupe.

I pored navedenih nedostataka, učešće HCMV u B-ćelijskoj kancerogenezi zahteva dalje ispitivanje. Studije koje bi obuhvatile populacije sa strogo definisanim patološkim B-ćelijskim profilom, uključujući bolesnike koji poseduju onkogene aberacije specifične za posebne entitete iz ove grupe pomogle bi u jasnijem sagledavanju odnosa HCMV infekcije i nastanka limfoma.

# Zaključci

---

- Učestalost HCMV infekcije u populaciji dece kod koje je urađena transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze u Srbiji iznosi 57,1%. U alogeno transplantiranih bolesnika infekcija je dokazana u 72,7% slučajeva.
- Najučestaliji gB genotip u pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze je gB4 (38,9%). U uzorcima su ređe detektovani gB1 (27,8%), gB2 (22,2%) i gB3 (11,1%). Prisustvo neprototipskog genotipa gB5 nije dokazano. Najčešće detektovan gN genotip je gN1 (34,6%), dok su ređe bili prisutni gN3b (23,1%), gN4b/c (19,2%), gN4a (15,4%) i gN2 (7,7%).
- Prisustvo više od jednog gB i/ili gN genotipa, odnosno mešana HCMV infekcija, je dokazana u 25% pedijatrijskih bolesnika. Mešane infekcije sa gB (21,4%) i gN (21%) genotipskim profilom su bile prisutne u približno podjednakom broju.
- Parovi HCMV genotipova sa značajno većom učestalošću koincidiranja su gB1/gB2, gB1/gN1 i gB4/gN3b. Parovi genotipova sa tendencijom da se ne javljaju zajedno jesu gB1/gN4b/c i gB2/gN3b.
- Najčešće genotipske varijante u odnosu na spektar svih kliničkih komplikacija su bile gB4 i gN1, koje su detektovane u 15 (36,6%) i 25 (40,3%) slučajeva, respektivno. Kod pedijatrijskih bolesnika sa letalnim ishodom najčešće su detektovani genotipovi gB1 (50%) i gN1 (50%). Kod bolesnika sa povoljnim ishodom bolesti, najčešći genotipovi su bili gB4 (36,4%) i gN1 (27,8%).
- Bolest kalema-protiv-domaćina je povezana sa većom učestalošću HCMV infekcije posle transplantacije ( $p < 0,05$ ). Kod drugih ispitivanih post-transplantacionih komplikacija ova značajnost nije uočena.
- U grupi pedijatrijskih bolesnika kod kojih je urađena alogena TMČH, značajno viši nivoi viremije su uočeni u devojčica i osoba sa nemalignom bolešću.
- Uzrast i pol pedijatrijskih bolesnika nisu značajni faktori u predikciji incidencije HCMV infekcije.
- Demografski neujednačene bolesničke populacije, mali broj ispitanika i različite metode detekcije HCMV infekcije u različitim istraživanjima onemogućavaju precizno definisanje molekularne epidemiologije gB i gN genotipova.

- Prevalencija infekcije izazvane HCMV kod adultnih bolesnika sa B-ćelijskim neoplazijama iznosi 90,4%, dok je u populaciji osoba mečovanih po godinama i polu, a bez hematološke maligne bolesti, prokuženost ovim virusom 82,6%.
- Odrasle osobe inficirane HCMV su značajno ređe obolele od B-ćelijskih neoplazija u odnosu na osobe bez HCMV infekcije ( $p < 0,035$ ).
- Postoji obrnuto srazmerna i visoko statistički značajna povezanost ( $p < 0,001$ ) između HCMV seroprevalencije i godišnje incidencije B-limfoidnih maligniteta širom sveta.

# Literatura

---

1. Ribbert H. Ueber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl All Pathol.* 1904;15: 945-948.
2. Jesionek A, Kiolemenoglou B. Ueber einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines hereditär-luetischen Foetus. *Muenchner Med Wochenschr.* 1904;51: 1905-1907.
3. Löwenstein C. Ueber protozoenartige Gebilde in den Organen von Kindern. *Zbl Allg Pathol.* 1907;18: 513-718.
4. Von Glahn WC, Pappenheimer AM. Intranuclear inclusions in visceral disease. *Am J Pathol.* 1925;1: 445-465.
5. Lipschuetz B. Untersuchungen ueber die Aetiologie der Krankheiten der Herpes genitalis. *Arch Dermatol Syph.* 1921;136: 428-482.
6. Farber S, Wolbach S. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (protozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of children. *Am J Pathol.* 1932;8: 123-135.
7. Wyatt JP, Saxton J, Lee RS, Pinkerton H. Generalized cytomegalic inclusion disease. *J Pediatr.* 1950;36: 271-294.
8. Farber S, Wolbach S. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (protozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of children. *Am J Pathol.* 1932;8: 123-135.
9. Wyatt JP, Saxton J, Lee RS, Pinkerton H. Generalized cytomegalic inclusion disease. *J Pediatr.* 1950;36: 271-294.
10. Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science.* 1949;109: 85-87.
11. Reddehase MJ. Margaret Gladys Smith, mother of cytomegalovirus: 60th anniversary of cytomegalovirus isolation. *Med Microbiol Immunol.* 2015;204: 239-241.
12. Weller TH, Macauley JC, Craig JM, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957;94: 4-12.
13. Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Pro Soc Exp Biol Med.* 1956;92: 418-424.
14. Weller TH. Serial propagation in vitro of agents producing inclusion bodies derived from varicella and herpes zoster. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;83: 340-346.
15. Weller TH. Cytomegalovirus: the difficult years. *J Infect Dis.* 1970;122: 532-539.
16. McGavran H, Smith MG. Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observation on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp Mol Pathol.* 1965;4: 1-10.
17. Homa FL, Brown JC. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol.* 1997;7: 107-122.



18. Bhella D, Rixon FJ, Dargan DJ. Cryomicroscopy of human cytomegalovirus virions reveals more densely packed genomic DNA than in herpes simplex virus type 1. *J Mol Biol.* 2000;295: 155-161.
19. Butcher SJ, Aitken J, Mitchell J, Gowen B, Dargan DJ. Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J Struct Biol.* 1998;124: 70-76.
20. Chang JT, Schmid MF, Rixon FJ, Chiu W. Electron cryotomography reveals the portal in the herpesvirus capsid. *J Virol.* 2007;81: 2065-2068.
21. Britt WJ, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol.* 2004;65: 395-402.
22. Stamminger T, Gstaiger M, Weinzierl K, Lorz K, Winkler M, Schaffner W. Open reading frame UL26 of human cytomegalovirus encodes a novel tegument protein that contains a strong transcriptional activation domain. *J Virol.* 2002;76: 4836-4847.
23. Kalejta RF, Shenk T. The human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) accelerates progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Virol.* 2003;77: 3451-3459.
24. Lee CP, Chen MR. Escape of herpesviruses from the nucleus. *Rev Med Virol.* 2010;20: 214-230.
25. Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H, Mann M, Ingolia NT, Weissman JS. *Decoding human cytomegalovirus.* *Science.* 2012;338: 1088-1093.
26. Patro ARK. Subversion of Immune Response by Human Cytomegalovirus. *Front Immunol.* 2019;10: 1155.
27. Balazs Z, Tombacz D, Szucs A, Csabai Z, Megyeri K, Petrov AN, Snyder M, Boldogkoi Z. Long-read sequencing of human cytomegalovirus transcriptome reveals RNA isoforms carrying distinct coding potentials. *Sci Rep.* 2017;7: 15989.
28. Gatherer D, Seirafian S, Cunningham C, Holton M, Dargan DJ, Baluchova K, Hector RD, Galbraith J, Herzyk P, Wilkinson GW, Davison AJ. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108: 19755-19760.
29. Weller TH, Hanshaw JB, Scott DE. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology.* 1960;108: 843-868.
30. Reeves MB. Chromatin-mediated regulation of cytomegalovirus gene expression. *Virus Res.* 2011;157: 134-143.
31. Isomura H, Stinski MF. Coordination of late gene transcription of human cytomegalovirus with viral DNA synthesis: recombinant viruses as potential therapeutic vaccine candidates. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17: 157-166.
32. Renzette N, Bhattacharjee B, Jensen JD, Gibson L, Kowalik TF. Extensive genome-wide variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS Pathog.* 2011;7: e1001344.
33. Fields Virology, 6th Edition Edited by David M. Knipe and Peter M. Howley. Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2456 pp.
34. Jiang XJ, Zhang J, Xiong Y, Jahn G, Xiong HR, Yang ZQ, Liu YY. Human cytomegalovirus glycoprotein polymorphisms and increasing viral load in AIDS patients. *PLoS One.* 2017;12: e0176160.
35. Nogueira E, Ozaki KS, Tomiyama H, Câmara NO, Granato CF. Clinical correlations of human cytomegalovirus strains and viral load in kidney transplant recipients. *Int Immunopharmacol.* 2009;9: 26-31.

36. Roubalová K, Strunecký O, Zufanová S, Procházka B, Vitek A. Genotyping of viral glycoprotein B (gB) in hematopoietic stem cell transplant recipients with active cytomegalovirus infection: analysis of the impact of gB genotypes on the patients' outcome. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2010;59: 92-99.
37. Manuel O, Asberg A, Pang X, Rollag H, Emery VC, Preiksaitis JK, Kumar D, Pescovitz MD, Bignamini AA, Hartmann A, Jardine AG, Humar A. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis*. 2009;49: 1160-1166.
38. Inagaki J, Noguchi M, Kurauchi K, Tanioka S, Fukano R, Okamura J. Effect of Cytomegalovirus Reactivation on Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22: 300-306.
39. Coquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2004;39: 155-161.
40. Sarcinella L, Mazzulli T, Willey B, Humar A. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype does not correlate with outcomes in liver transplant patients. *J Clin Virol*. 2002;24: 99-105.
41. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72: 249-265, table of contents.
42. Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol*. 2004;78: 4444-4453.
43. Smith MS, Bivins-Smith ER, Tilley AM, Bentz GL, Chan G, Minard J, Yurochko AD. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB in human cytomegalovirus-mediated monocyte diapedesis and adhesion: strategy for viral persistence. *J Virol*. 2007;81:7683-7694.
44. Nogalski MT, Chan G, Stevenson EV, Gray S, Yurochko AD. Human cytomegalovirus-regulated paxillin in monocytes links cellular pathogenic motility to the process of viral entry. *J Virol*. 2011;85: 1360-1369.
45. Chan G, Nogalski MT, Stevenson EV, Yurochko AD. Human cytomegalovirus induction of a unique signalsome during viral entry into monocytes mediates distinct functional changes: a strategy for viral dissemination. *J Leukoc Biol*. 2012;92: 743-752.
46. Stevenson EV, Collins-McMillen D, Kim JH, Cieply SJ, Bentz GL, Yurochko AD. HCMV reprogramming of infected monocyte survival and differentiation: a Goldilocks phenomenon. *Viruses*. 2014;6: 782-807.
47. Stinski MF. Molecular basis of cytomegalovirus. In: Roizman B, editor. *Herpesviruses*. Plenum Publishing Corp; New York: 1983. pp. 67-113.
48. Hecker M, Qiu D, Marquardt K, Bein G, Hackstein H. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sang*. 2004 Jan;86: 41-44.
49. Alshammari FD. Association between HPV, CMV, EBV and HS Viruses and Breast Cancer in Saudi Arabia. *J Cancer Prev Curr Res*. 7:00236.
50. Centers for Disease Control and Prevention. Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV infection. <https://www.cdc.gov/cmV/overview.html>. (published 29 April 2020).
51. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988- 1994. *Clin Infect Dis*. 2006;43: 1143-1151.

52. Ahlfors K. IgG antibodies to cytomegalovirus in a normal urban Swedish population. *Scand J Infect Dis.* 1984;16: 335-337.
53. Varga M, Görög D, Kári D, Környei E, Kis É, Túryné HJ, Jankovics I, Péter A, Toronyi É, Sárváry E, Fazakas J, Reusz G. Cytomegalovirus seroprevalence among solid organ donors in Hungary: correlations with age, gender, and blood group. *Transplant Proc.* 2011;43: 1233-1235.
54. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis.* 2010;50: 1439-1447.
55. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* 2010;20: 202-213.
56. Lachmann R, Loenenbach A, Waterboer T, Brenner N, Pawlita M, Michel A, Thamm M, Poethko-Müller C, Wichmann O, Wiese-Posselt M. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS One.* 2018;13(7): e0200267.
57. Marshall GS, Rabalais GP, Stewart JA, Dobbins JG. Cytomegalovirus seroprevalence in women bearing children in Jefferson County, Kentucky. *Am J Med Sci.* 1993;305: 292-296.
58. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, Griffiths P. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2019;29: e2034.
59. Institute of Medicine Committee to Study Priorities for Vaccine Development. The National Academies Collection: reports funded by National Institutes of Health. In: Stratton KR, Durch JS, Lawrence RS, eds. *Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decisionmaking.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2000.
60. Arvin AM, Fast P, Myers M, Plotkin S, Rabinovich R. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin Infect Dis.* 2004;39: 233-239.
61. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* 2015;235: 288-297.
62. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* 2007;17: 355-363.
63. Griffiths PD, Emery VC. Cytomegalovirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology.* Churchill Livingstone Inc; Secaucus, NJ: 1997. pp. 445-470.
64. Rubin RH. The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. *JAMA.* 1989;261: 3607-3609.
65. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia.* 2009;11: 1-9.
66. Francis SS, Wallace AD, Wendt GA, et al. In utero cytomegalovirus infection and development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017;129: 1680-1684.
67. Wiemels JL, Talbäck M, Francis S, Feychting M. Early Infection with Cytomegalovirus and Risk of Childhood Hematologic Malignancies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019 Jun;28(6):1024-1027.
68. Herbein G. The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis. *Viruses.* 2018;10: 408.
69. European Society for Blood and Marrow Transplantation. EBMT Publications. Available at: <https://www.ebmt.org/research/ebmt-publications>. Accessed 5 May 2020.

70. Pignatelli S, Maurizio D, Ladini MP, Dal Monte P. Development of a multiplex PCR for the simultaneous amplification and genotyping of glycoprotein N among human cytomegalovirus strains. *New Microbiol.* 2010;33: 257-262.
71. Tarrago D, Quereda C, Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 2872-2877.
72. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13 Suppl 4: 93-106.
73. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, Piskis A, Razonable RR, Miller V, Griffiths PD; Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis.* 2017;64: 87-91.
74. WHO. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. Available from: <https://gco.iarc.fr/> [8.2.2022.]
75. De Campos Dieamant D, Bonon SH, Prates LC, Belangelo VM, Pontes ER, Costa SC. Active human cytomegalovirus infection and glycoprotein b genotypes in brazilian pediatric renal or hematopoietic stem cell transplantation patients. *Braz J Microbiol.* 2010;41(1): 50-58.
76. Yoon HS, Lee JH, Choi ES, Seo JJ, Moon HN, Kim MN, Im HJ. Cytomegalovirus infection in children who underwent hematopoietic stem cell transplantation at a single center: a retrospective study of the risk factors. *Pediatr Transplant.* 2009;13: 898-905.
77. Qayed M, Khurana M, Hilinski J, Gillespie S, McCracken C, Applegate K, Chiang K-Y, Horan J. Risk for CMV reactivation in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(2): 364-366.
78. Paris C, Kopp K, King A, Santolaya ME, Zepeda AJ, Palma J. Cytomegalovirus infection in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation in Chile. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53: 453-458.
79. Gaziev J, Nguyen L, Puozzo C, Mozzi AF, Casella M, Perrone Donnorso M, Gravina P, Sodani P, Marziali M, Isgrò A, Simone MD, Andreani M, Formosa A, Testi M, Federici G, Bernardini S, Lucarelli G. Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamics profile with therapeutic drug monitoring. *Blood.* 2010;115: 4597-4604.
80. Bonon SH, Menoni SM, Rossi CL, De Souza CA, Vigorito AC, Costa DB, Costa SC. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infect.* 2005;50: 130-137.
81. Dieamant DC, Bonon SH, Peres RM, Costa CR, Albuquerque DM, Miranda EC, Aranha FJ, Oliveira-Duarte G, Fernandes VC, De Souza CA, Costa SC, Vigorito AC. Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infect Dis.* 2013;13: 310.
82. Yakushiji K, Gondo H, Kamezaki K, Shigematsu K, Hayashi S, Kuroiwa M, Taniguchi S, Ohno Y, Takase K, Numata A, Aoki K, Kato K, Nagafuji K, Shimoda K, Okamura T, Kinukawa N, Kasuga N, Sata M, Harada M. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29: 599-606.

83. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, Kottaridis PD, Peggs K, O'Gorman P, Chakraverty R, Marshall T, Osman H, Mahendra P, Craddock C, Waldmann H, Hale G, Fegan CD, Yong K, Goldstone AH, Linch DC, Milligan DW. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood*. 2002;99: 4357–4363.
84. George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, Hertzberg M, Gottlieb D, Bradstock K. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis*. 2010;12: 322–329.
85. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11: 466–474.
86. Schleiss MR. Recombinant cytomegalovirus glycoprotein B vaccine: Rethinking the immunological basis of protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115: 6110–6112.
87. Kropff B, Burkhardt C, Schott J, Nentwich J, Fisch T, Britt W, Mach M. Glycoprotein N of human cytomegalovirus protects the virus from neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*. 2012;8: e1002999.
88. González-Ramírez J, Uribe-Gutiérrez G, Jiménez-Hernández E, Velázquez-Guadarrama N, Bello-González A, Vazquez-Meraz E, Arellano-Galindo J. Cytomegalovirus gB genotype distribution in Mexican children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Intervirology*. 2012;55: 318–320.
89. Khalafkhany D, Makhdoomi K, Taghizadeh Afshari A, Motazakker M. Prevalence and genotype distribution of cytomegalovirus UL55 sequence in renal transplant recipients in north west of Iran. *J Med Virol*. 2016;88: 1622–1627.
90. Humar A, Kumar D, Gilbert C, Boivin G. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. *J Infect Dis*. 2003;188: 581–584.
91. Zawilinska B, Szostek S, Kopec J, Piatkowska-Jakubas B, Kosz-Vnenchak M. Multiplex real-time PCR to identify a possible reinfection with different strains of human cytomegalovirus in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Acta Biochim Pol*. 2016;63: 161–166.
92. Wu X, Wang Y, Xu Y, Wu D, Sun A, Zhu Z, Han Y, Qiu H, Tang X, Fu Z, He G, Li C, Ma X, Liu Y. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype in hematopoietic stem cell transplant patients from China. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16: 647–652.
93. Pang X, Humar A, Preiksaitis JK. Concurrent genotyping and quantitation of cytomegalovirus gB genotypes in solid-organ-transplant recipients by use of a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2008;46: 4004–4010.
94. Xia CS, Zhang Z. Analysis of human cytomegalovirus glycoprotein N genotypes in Chinese hematopoietic stem cell transplant recipients. *Arch Virol*. 2011;156: 17–23.
95. Rossini G, Pignatelli S, Dal Monte P, Camozzi D, Lazzarotto T, Gabrielli L, Gatto MR, Landini MP. Monitoring for human cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients through antigenemia and glycoprotein N (gN) variants: evidence of correlation and potential prognostic value of gN genotypes. *Microbes Infect*. 2005;7: 890–896.
96. Miller W, Flynn P, McCullough J, Balfour HH Jr, Goldman A, Haake R, McClave P, Ramsay N, Kersey J. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-v-host disease. *Blood*. 1986;67: 1162–1167.

97. Martino R, Rovira M, Carreras E, Solano C, Jorge S, De La Rubia J, Caballero MD, de Oteyza JP, Zuazu J, Moraleda JM, Ojeda E, Ferrá C, Serrano D, De La Cámara R, Urbano-Ispizua A, Brunet S. Severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a matched-pair comparison of unmanipulated and CD341 cell-selected transplantation. *Haematologica*. 2001;86: 1075-1086.
98. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, Barkholt L, Larsson K, Winiarski J, Yun Z, Ringdén O. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006;91: 78-83.
99. Zaucha-Prazmo A, Wójcik B, Drabko K, Choma M, Kowalczyk JR. Cytomegalovirus (CMV) infections in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005;22): 271-276.
100. Laberko A, Bogoyavlenskaya A, Shelikhova L, Shekhovtsova Z, Balashov D, Voronin K, Kurnikova E, Boyakova E, Raykina E, Brilliantova V, Pirumova V, Novichkova G, Maschan A, Maschan M. Risk Factors for and the Clinical Impact of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Infections in Pediatric Recipients of TCR- $\alpha/\beta$ - and CD19-Depleted Grafts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23: 483-490.
101. Jaing TH, Chang TY, Chen SH, Wen YC, Yu TJ, Lee CF, Yang CP, Tsay PK. Factors associated with cytomegalovirus infection in children undergoing allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98: e14172.
102. Valadkhani B, Kargar M, Ashouri A, Hadjibabaie M, Gholami K, Ghavamzadeh A. The risk factors for cytomegalovirus reactivation following stem cell transplantation. *J Res Pharm Pract*. 2016;5: 63-69.
103. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, Halter J, Heim D, Tichelli A, Gratwohl A, Stern M. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16: 1309-1314.
104. Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE, Couriel DR, Giralt SA, de Lima M, Khouri IF, Hosing C, Kornblau SM, Anderlini P, Shpall EJ, Qazilbash MH, Molldrem JJ, Chemaly RF, Komanduri KV. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40: 125-136.
105. Yang R, Zhang R, Zhang Y, Huang Y, Liang H, Gui G, Gong S, Wang H, Xu M, Fan J. Risk Factors Analysis for Human Cytomegalovirus Viremia in Donor+/Recipient+ Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Lab Med*. 2020;51: 74-79.
106. Haastrup E, Müller K, Baekgaard H, Heilmann C. Cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplant in children. *Pediatr Transplant*. 2005;9: 734-740.
107. Goldsmith SR, Slade M, Lawrence SJ, DiPersio JF, Westervelt P, Uy GL, Dubberke E, Gao F. Cytomegalovirus viremia and relapse after haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22 Suppl 320: 473.
108. Goldsmith SR, Slade M, DiPersio JF, Westervelt P, Lawrence SJ, Uy GL, Abboud CN, Vij R, Schroeder MA, Fehniger TA, Dubberke ER, Trinkaus K, Romee R. Cytomegalovirus viremia, disease, and impact on relapse in T-cell replete peripheral blood haploidentical hematopoietic cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Haematologica*. 2016;101: e465-e468.

109. Schetelig J, Oswald O, Steuer N, Radonic A, Thulke S, Held TK, Oertel J, Nitsche A, Siegert W. Cytomegalovirus infections in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32: 695–701.
110. Takenaka K, Nishida T, Asano-Mori Y, Oshima K, Ohashi K, Mori T, Kanamori H, Miyamura K, Kato C, Kobayashi N, Uchida N, Nakamae H, Ichinohe T, Morishima Y, Suzuki R, Yamaguchi T, Fukuda T. Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation is Associated with a Reduced Risk of Relapse in Patients with Acute Myeloid Leukemia Who Survived to Day 100 after Transplantation: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation Transplantation-related Complication Working Group. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21: 2008–2016.
111. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, Gibran NS, Huang ML, Santo Hayes TK, Corey L, Boeckh M. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA.* 2008;300: 413–422.
112. Van Boven M, van de Kasstele J, Korndewal MJ, van Dorp CH, Kretzschmar M, van der Klis F, de Melker HE, Vossen AC, van Baarle D. Infectious reactivation of cytomegalovirus explaining age- and sex-specific patterns of seroprevalence. *PLoS Comput Biol.* 2017;13: e1005719.
113. Sackman AM, Pfeifer SP, Kowalik TF, Jensen JD. On the Demographic and Selective Forces Shaping Patterns of Human Cytomegalovirus Variation within Hosts. *Pathogens.* 2018;7: 16.
114. Teira P, Battiwalla M, Ramanathan M, Barrett AJ, Ahn KW, Chen M, Green JS, Saad A, Antin JH, Savani BN, Lazarus HM, Seftel M, Saber W, Marks D, Aljurf M, Norkin M, Wingard JR, Lindemans CA, Boeckh M, Riches ML, Auletta JJ. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. *Blood.* 2016;127: 2427–2438.
115. Ariza-Heredia EJ, Neshler L, Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett.* 2014;342: 1–8.
116. Vinuesa V, Bracho MA, Albert E, Solano C, Torres-Puente M, Giménez E, González-Candelas F, Navarro D. The impact of virus population diversity on the dynamics of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Gen Virol.* 2017;98: 2530–2542.
117. Howden BP, Michaelides A, Spelman DW, Spencer A, Schwarzer AP, Wesselingh S, Kotsimbos TC. Cytomegalovirus viral load monitoring after allogeneic bone marrow transplantation in patients receiving antiviral prophylaxis. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32: 795–800.
118. Parry HM, Zuo J, Frumento G, Mirajkar N, Inman C, Edwards E, Griffiths M, Pratt G, Moss P. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immun Ageing.* 2016;13: 1.
119. Habib K, Lamia T, Amel L, Abdelrahmen A, Saloua L, Hana E, Amine S, Bechir Z, Tarek BO, Assia BH. Time of onset, viral load, relapse, and duration of active cytomegalovirus infection in bone marrow transplant outcomes. *Exp Clin Transplant.* 2008;6: 67–73.
120. De Matos SB, Meyer R, Lima FW. Seroprevalence and serum profile of cytomegalovirus infection among patients with hematologic disorders in Bahia State, Brazil. *J Med Virol.* 2011;83: 298–304.

121. Ng AP, Worth L, Chen L, Seymour JF, Prince HM, Slavin M, Thursky K. Cytomegalovirus DNAemia and disease: incidence, natural history and management in settings other than allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005;90: 1672-1679.
122. Marchesi F, Pimpinelli F, Gumenyuk S, Renzi D, Palombi F, Pisani F, Romano A, Spadea A, Papa E, Canfora M, Ensoli F, Mengarelli A. Cytomegalovirus reactivation after autologous stem cell transplantation in myeloma and lymphoma patients: A single-center study. *World J Transplant*. 2015;5: 129-136.
123. Capria S, Gentile G, Capobianchi A, Cardarelli L, Gianfelici V, Trisolini SM, Foà R, Martino P, Meloni G. Prospective cytomegalovirus monitoring during first-line chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *J Med Virol*. 2010;82: 1201-1207.
124. Zaidi ARZ, Al-Ammari MO, Al-Naamani M, Altaf SY, AlShehry N, Tailor IK, Motabi IH, AlGhamdi MS, Zaidi SZA. Very High Seroprevalence of CMV and EBV Among a Large Series of Patients with Hematological Malignancies at a Tertiary Care Center in Saudi Arabia - a Case for Investigating Cooperativity of Viruses in Carcinogenesis? *Blood*. 2019;134 (Issue Suppl\_1): 5818.
125. Xuan L, Huang F, Fan Z, Zhou H, Zhang X, Yu G, Zhang Y, Liu C, Sun J, Liu Q. Effects of intensified conditioning on Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2012;5: 46.
126. Liu YC, Lu PL, Hsiao HH, Chang CS, Liu TC, Yang WC, Lin SF. Cytomegalovirus infection and disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: experience in a center with a high seroprevalence of both CMV and hepatitis B virus. *Ann Hematol*. 2012;91: 587-595.
127. Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kato S, Kasahara S, Iseki T, Yamaguchi T, Tojo A, Asano S. Impact of cytomegalovirus serostatus on outcome of unrelated cord blood transplantation for adults: a single-institute experience in Japan. *Eur J Haematol*. 2008;80: 251-257.
128. Ljungman P, Brand R. Factors influencing cytomegalovirus seropositivity in stem cell transplant patients and donors. *Haematologica*. 2007;92: 1139-1142.
129. Bernson E, Hallner A, Sander FE, Nicklasson M, Nilsson MS, Christenson K, Aydin E, Liljeqvist JÅ, Brune M, Foà R, Aurelius J, Martner A, Hellstrand K, Thorén FB. Cytomegalovirus Serostatus Affects Autoreactive NK Cells and Outcomes of IL2-Based Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Immunol Res*. 2018;6: 1110-1119.
130. Piukovics K, Terhes G, Gurbity-Pálfi T, Bereczki Á, Rárosi F, Deák J, Borbényi Z, Urbán E. Cytomegalovirus infection in patients with haematological diseases and after autologous stem cell transplantation as consolidation: a single-centre study. *Ann Hematol*. 2017;96: 125-131.
131. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V, Weisdorf D, Confer DL. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*. 2001;98: 2043-2051.
132. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002;185: 273-282.



133. Pourgheysari B, Bruton R, Parry H, Billingham L, Fegan C, Murray J, Moss P. The number of cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4<sup>+</sup> T-cell repertoire. *Blood*. 2010;116: 2968-2974.
134. Dafalla ABY, Elnil YFH, Gorish BMT. Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection among Leukemic Patients in Khartoum State. *Virology*. 2018;7: 2.
135. Ballanger F, Bressollette C, Volteau C, Planche L, Dreno B. Cytomegalovirus: its potential role in the development of cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol*. 2009;18: 574-576.
136. Herne KL, Taipur R, Breuer-McHam J, Champlin R, Duvic M. Cytomegalovirus seropositivity is significantly associated with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood*. 2003;101: 2132-2136.
137. Nakhoul H, Lin Z, Wang X, Roberts C, Dong Y, Flemington E. High-Throughput Sequence Analysis of Peripheral T-Cell Lymphomas Indicates Subtype-Specific Viral Gene Expression Patterns and Immune Cell Microenvironments. *mSphere*. 2019;4: e00248-19.
138. Cheeran MC-J, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22: 99-126.
139. Cinatl J Jr., Cinatl J, Vogel JU, Rabenau H, Kornhuber B, Doerr HW. Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology*. 1996;39: 259-269.
140. Cinatl J Jr, Vogel JU, Cinatl J, Weber B, Rabenau H, Novak M, Kornhuber B, Doerr HW. Long-term productive human cytomegalovirus infection of a human neuroblastoma cell line. *Int J Cancer*. 1996;65: 90-96.
141. Dey M, Ahmed AU, Lesniak MS. Cytomegalovirus and glioma: putting the cart before the horse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86: 191-199.
142. Nelson JA, Fleckenstein B, Jahn G, Galloway DA, McDougall JK. Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD169. *J Virol*. 1984;49: 109-115.
143. Boldogh I, Huang ES, Rady P, Arany I, Tying S, Albrecht T. Alteration in the coding potential and expression of H-ras in human cytomegalovirus-transformed cells. *Intervirology*. 1994;37: 321-329.
144. Shen Y, Zhu H, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94: 3341-3345.
145. Doniger J, Muralidhar S, Rosenthal LJ. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12: 367-382.
146. Hermouet S, Sutton CA, Rose TM, Greenblatt RJ, Corre I, Garand R, Neves AM, Bataille R, Casey JW. Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia*. 2003;17: 185-195.
147. Oberstein A, Shenk T. Cellular responses to human cytomegalovirus infection: Induction of a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114: E8244-E8253.
148. Kumar A, Coquard L, Pasquereau S, Russo L, Valmary-Degano S, Borg C, Pothier P, Herbein G. Tumor control by human cytomegalovirus in a murine model of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3: 16012.
149. Jurak I, Brune W. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *EMBO J*. 2006;25: 2634-2642.

150. Erlach KC, Böhm V, Seckert CK, Reddehase MJ, Podlech J. Lymphoma cell apoptosis in the liver induced by distant murine cytomegalovirus infection. *J Virol.* 2006;80: 4801-4819.
151. Erlach KC, Podlech J, Rojan A, Reddehase MJ. Tumor control in a model of bone marrow transplantation and acute liver-infiltrating B-cell lymphoma: an unpredicted novel function of cytomegalovirus. *J Virol.* 2002;76: 2857-2870.
152. Erkes DA, Wilski NA, Snyder CM. Intratumoral infection by CMV may change the tumor environment by directly interacting with tumor-associated macrophages to promote cancer immunity. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13: 1778-1785.
153. Yang R, Liang J, Xu GX, Ding LM, Huang HM, Su QZ, Yan J, Li YC. Human cytomegalovirus glycoprotein B inhibits migration of breast cancer MDA-MB-231 cells and impairs TGF- $\beta$ /Smad2/3 expression. *Oncol Lett.* 2018;15: 7730-7738.
154. Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trenchel R, Ditschkowski M, Christoph S, Gromke T, Kordelas L, Ottinger HD, Ross RS, Horn PA, Schnittger S, Beelen DW. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: Evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2011;118: 1402-1412.
155. Green ML, Leisenring WM, Xie H, Walter RB, Mielcarek M, Sandmaier BM, Riddell SR, Boeckh M. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122: 1316-1324.
156. Koldehoff M, Ross SR, Dührsen U, Beelen DW, Elmaagacli AH. Early CMV-replication after allogeneic stem cell transplantation is associated with a reduced relapse risk in lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2017;58: 822-833.
157. Litjens NHR, van der Wagen L, Kuball J, Kwekkeboom J. Potential Beneficial Effects of Cytomegalovirus Infection after Transplantation. *Front Immunol.* 2018;9: 389.
158. Koldehoff M, Lindemann M, Opalka B, Bauer S, Ross RS, Elmaagacli AH. Cytomegalovirus induces apoptosis in acute leukemia cells as a virus-versus-leukemia function. *Leuk Lymphoma.* 2015;56: 3189-3197.
159. Ben-Bassat I, Raanani P, Gale RP. Graft-versus-leukemia in chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39: 441-446.
160. Gustafsson B, Jernberg AG, Priftakis P, Bogdanovic G. No CMV DNA in Guthrie cards from children who later developed ALL. *Pediatr Hematol Oncol.* 2006;23: 199-205.
161. MacKenzie J, Gallagher A, Clayton RA, Perry J, Eden OB, Ford AM, Greaves MF, Jarrett RF. Screening for herpesvirus genomes in common acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2001;15(3): 415-442.
162. Torres HA, Kontoyiannis DP, Aguilera EA, Younes A, Luna MA, Tarrand JJ, Noguerras GM, Raad II, Chemaly RF. Cytomegalovirus infection in patients with lymphoma: An important cause of morbidity and mortality. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2006;6: 393-398.
163. Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 2017;390: 298-310.
164. Clarke CA, Glaser SL, Gomez SI, Wang SS, Keegan TH, Yang J, Chang ET. Lymphoid malignancies in US Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20: 1064-1077.
165. Li Y, Wang Z, Yi D, Ma S. Racial Differences in Three major NHL Subtypes: Descriptive epidemiology. *Cancer Epidemiol.* 2015;39: 8-13.
166. Hoshiba T, Asamoto A, Yabuki Y. Decreasing seropositivity of cytomegalovirus of pregnant women in Japan. *Nihon Rinsho.* 1998;56: 193-196.

167. Chihara D, Ito H, Matsuda T, Shibata A, Katsumi A, Nakamura S, Tomotaka S, Morton LM, Weisenburger DD, Matsuo K. Differences in incidence and trends of haematological malignancies in Japan and the United States. *Br J Haematol*. 2014;164: 536-545.
168. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin DM, Whelan S (Eds.). *International Classification of Diseases for Oncology*. 3rd ed. World Health Organization, Malta; 2013.
169. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127: 2375-2390.
170. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (Eds.). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. National Cancer Institute, Bethesda, MD ([https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/)). Non-Hodgkin Lymphoma (Tab. 19.5), Hodgkin Lymphoma (Tab. 9.5), Leukemia (Tab. 13.5), Myeloma (Tab. 18.5), Age-Adjusted SEER Incidence Rates (Tab. 1.26, per 100,000 and age-adjusted to the 2000 US Std. Population).
171. Yaqo RT, Jalal SD, Ghafour KJ, Hassan HA, Hughson MD. Non-Hodgkin lymphoma in the Middle East is characterized by low incidence rates with advanced age. *J Glob Oncol*. 2019;1-10.
172. Tomoka T, Montgomery ND, Eric Powers E, Dhungel MB, Morgan EA, Mulenga M, Gopal S, Fedoriw Y. Lymphoma and Pathology in Sub-Saharan Africa: Current Approaches and Future Directions. *Clin Lab Med*. 2018;38: 91-100.
173. Bassig BA, Au X-Y, Mang Q, Ngan R, Morton LM, Dennis KM, Ip DKM, Hu W, Zheng T, Seow WJ, Xu J, Lan Q, Rothman N. Subtype-specific incidence rates of lymphoid malignancies in Hong Kong compared to the United States, 2001-2010. *Cancer Epidemiol*. 2016;42: 15-23.
174. Fassas AB, Bolaños-Meade J, Buddharaju LN, Rapoport A, Cottler-Fox M, Chen T, Lovchik JC, Cross A, Tricot G. Cytomegalovirus infection and non-neutropenic fever after autologous stem cell transplantation: high rates of reactivation in patients with multiple myeloma and lymphoma. *Br J Haematol*. 2001;112: 237-241.
175. Nguyen Q, Estey E, Raad I, Rolston K, Kantarjian H, Jacobson K, Konoplev S, Ghosh S, Luna M, Tarrand J, Whimbey E. Cytomegalovirus Pneumonia in Adults with Leukemia: An Emerging Problem. *Clin Infect Dis*. 2001;32(4): 539-545.
176. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007;110: 4576-4583.
177. Behrendt CE, Rosenthal J, Bolotin E, Nakamura R, Zaia J, Forman SJ. Donor and Recipient CMV Serostatus and Outcome of Pediatric Allogeneic HSCT for Acute Leukemia in the Era of CMV Preemptive Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15: 54-60.
178. Ferrés M, Nervi B, Ramírez P. Prophylaxis against cytomegalovirus infection in pediatric and adult patients undergoing solid organ and hematopoietic stem cells transplantation. *Rev Chilena Infectol*. 2012;29 (Suppl. 1): 23-28.

179. Duval M, Klein JP, He W, Cahn JY, Cairo M, Camitta BM, Kamble R, Copelan E, de Lima M, Gupta V, Keating A, Lazarus HM, Litzow MR, Marks DI, Maziarz RT, Rizzieri DA, Schiller G, Schultz KR, Tallman MS, Weisdorf D. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Acute Leukemia in Relapse or Primary Induction Failure. *J Clin Oncol*. 2010;28: 3730-3738.
180. Cornelissen JJ, Carston M, Kollman C, King R, Dekker AW, Löwenberg B, Anasetti C. Unrelated marrow transplantation for adult patients with poor-risk acute lymphoblastic leukemia: strong graft-versus-leukemia effect and risk factors determining outcome. *Blood*. 2001;97: 1572-1577.
181. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY, Badshah C. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2017;377: 2433-2444.
182. Fleming T, Dunne J, Crowley B. *Ex vivo* monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8(+) T-Cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish hospital. *J Med Virol*. 2010;82: 433-440.
183. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood*. 2003;102: 4255-4260.
184. Ljungman P, Brand R, Hoek J, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Styczynski J, Ward KN, Cesaro S; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Donor cytomegalovirus status influences the outcome of allogeneic stem cell transplant: a study by the European group for blood and marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 2014;59: 473-481.
185. Ljungman P, de La Camara R, Milpied N, Volin L, Russell CA, Crisp A, Webster A; Valacyclovir International Bone Marrow Transplant Study Group. Randomized study of valacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood*. 2002;99: 3050-3056.
186. Mehta RS, Holtan SG, Wang T, Hemmer MT, Spellman SR, Arora M, Couriel DR, Alousi AM, Pidala J, Abdel-Azim H, Ahmed I, Aljurf M, Askar M, Auletta JJ, Bhatt V, Bredeson C, Chhabra S, Gadalla S, Gajewski J, Gale RP, Gergis U, Hematti P, Hildebrandt GC, Inamoto Y, Kitko C, Khandelwal P, MacMillan ML, Majhail N, Marks DI, Mehta P, Nishihori T, Olsson RF, Pawarode A, Diaz MA, Prestidge T, Qayed M, Rangarajan H, Ringden O, Saad A, Savani BN, Seo S, Shah A, Shah N, Schultz KR, Solh M, Spitzer T, Szer J, Teshima T, Verdonck LF, Williams KM, Wirk B, Wagner J, Yared JA, Weisdorf DJ. GRFS and CRFS in alternative donor hematopoietic cell transplantation for pediatric patients with acute leukemia. *Blood Adv*. 2019;3: 1441-1449.
187. Rubio MT, Savani BN, Labopin M, Polge E, Niederwieser D, Ganser A, Schwerdtfeger R, Ehninger G, Finke J, Renate A, Craddock C, Kröger N, Hallek M, Jindra P, Mohty M, Nagler A. The impact of HLA-matching on reduced intensity conditioning regimen unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in patients above 50 years – a report from the EBMT acute leukemia working party. *J Hematol Oncol*. 2016;9: 65.

188. Dalle JH, Balduzzi A, Bader P, Lankester A, Yaniv I, Wachowiak J, Pieczonka A, Bierings M, Yesilipek A, Sedláček P, Ifversen M, Sufliarska S, Toporski J, Glogova E, Poetschger U, Peters C. Allogeneic Stem Cell Transplantation from HLA-Mismatched Donors for Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated According to the 2003 BFM and 2007 International BFM Studies: Impact of Disease Risk on Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24: 1848-1855.
189. Roth-Guepin G, Canaani J, Ruggeri A, Labopin M, Finke J, Cornelissen JJ, Delage J, Stuhler G, Rovira M, Potter M, Stadler M, Veelken H, Cahn JY, Collin M, Beguin Y, Giebel S, Nagler A, Mohty M. Allogeneic stem cell transplantation in acute lymphoblastic leukemia patients older than 60 years: a survey from the acute leukemia working party of EBMT. *Oncotarget*. 2017;8: 112972-112979.
190. Debaugnies F, Busson L, Ferster A, Lewalle P, Azzi N, Aoun M, Verhaegen G, Mahadeb B, de Marchin J, Vandenberg O, Hallin M. Detection of Herpesviridae in Whole Blood by Multiplex PCR DNABased-Microarray Analysis after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Clin Microb*. 2014;52: 2552-2556.
191. Kielsen K, Enevold C, Heilmann C, Sengeløv H, Pedersen AE, Ryder LP, Müller K. Donor Genotype in the Interleukin-7 Receptor  $\alpha$ -Chain Predicts Risk of Graft-versus-Host Disease and Cytomegalovirus Infection after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2018;9: 109.
192. Meijer E, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, Weersink AJL, Verdonck LF. Influence of Cytomegalovirus Seropositivity on Outcome after T Cell-Depleted Bone Marrow Transplantation: Contrasting Results between Recipients of Grafts from Related and Unrelated Donors. *Clin Infect Dis*. 2002;35: 703-712.
193. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Löwenberg B, Cornelissen JJ. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*. 2000;95: 2240-2245.
194. Jaskula E, Dlubek D, Tarnowska A, Lange J, Mordak-Domagala M, Suchnicki K, Sedzimirska M, Borowik A, Mizia S, Lange A. Anti-CMV-IgG positivity of donors is beneficial for alloHSCT recipients with respect to the better short-term immunological recovery and high level of CD4+CD25high lymphocytes. *Viruses*. 2015;7: 1391-1408.
195. Michálek J, Horvath R. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human herpesvirus 6 infections in children with cancer. *BMC Pediatr*. 2002;2: 1.
196. Kröger N, Zabelina T, Krüger W, Renges H, Stute N, Schrum J, Kabisch H, Schafhausen P, Jaburg N, Löliger C, Schäfer P, Hinke A, Zander AR. Patient cytomegalovirus seropositivity with or without reactivation is the most important prognostic factor for survival and treatment-related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin. *Br J Haematol*. 2001;113: 1060-1071.
197. Vdovin AS, Filkin SY, Yefimova PR, Sheetikov SA, Kapranov NM, Davydova YO, Egorov ES, Khamaganova EG, Drovok MY, Kuzmina LA, Parovichnikova EN, Efimov GA, Savchenko VG. Recombinant MHC Tetramers for Isolation of Virus-Specific CD8 + Cells from Healthy Donors: Potential Approach for Cell Therapy of Posttransplant Cytomegalovirus Infection. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81: 1371-1383.
198. Peric Z, Wilson J, Durakovic N, Ostojic A, Desnica L, Vranjes VR, Marekovic I, Serventi-Seiwerth R, Vrhovac R. Early human cytomegalovirus reactivation is associated with lower incidence of relapse of myeloproliferative disorders after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53: 1450-1456.

199. Mariotti J, Maura F, Spina F, Roncari L, Dodero A, Farina L, Montefusco V, Carniti C, Sarina B, Patriarca F, Rambaldi A, Onida F, Olivieri A, Zallio F, Corradini P. Impact of Cytomegalovirus Replication and Cytomegalovirus Serostatus on the Outcome of Patients with B Cell Lymphoma after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20: 885-890.
200. Schmidt-Hieber M, Labopin M, Beelen D, Volin L, Ehninger G, Finke J, Socié G, Schwerdtfeger R, Kröger N, Ganser A, Niederwieser D, Polge E, Blau IW, Mohty M. CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report. *Blood*. 2013;122: 3359-3364.
201. Piñana JL, Martino R, Barba P, Margall N, Roig MC, Valcárcel D, Sierra J, Rabella N. Cytomegalovirus infection and disease after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-centre experience. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45: 534-542.
202. Al-Sweedan S, Al-Seraihy A, Al-Ahmari A, Al-Jefri A, Mohammed V, Jafri R, Siddiqui K, Ayas M. Factors Determining the Outcome of Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia at King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Saudi Arabia. *J Pediatr Hematol/Oncol*. 2017;39: 33-37.
203. Al-Hajjar S, Al Seraihi A, Al Muhsen S, Ayas M, Al Jumaah S, Al Jefri A, Shoukri M, El Solh H. Cytomegalovirus infections in unrelated cord blood transplantation in pediatric patients: Incidence, risk factors, and outcomes. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2011;4: 67-72.
204. Hussein AA, Al-Antary ET, Najjar R, Al-Hamdan DS, Al-Zaben A, Frangoul H. Incidence and risk factors for cytomegalovirus (CMV) reactivation following autologous hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62: 1099-1101.
205. Al Mana H, Yassine HM, Younes NN, Al-Mohannadi A, Al-Sadeq DW, Alhababi D, Nasser EA, Nasrallah GK. The Current Status of Cytomegalovirus (CMV) Prevalence in the MENA Region: A Systematic Review. *Pathogens*. 2019;8: 213.
206. Cohen L, Yeshurun M, Shpilberg O, Ram R. Risk factors and prognostic scale for cytomegalovirus (CMV) infection in CMV-seropositive patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2015;17: 510-517.
207. Safabakhsh H, Tehranian F, Tehranian B, Hatami H, Karimi G, Shahabi M. Prevalence of anti-CMV antibodies in blood donors in Mashhad, Iran. *Iran J Epidemiol*. 2013;9: 52-57.
208. Sepehrvand N, Khameneh ZR, Eslamloo H-RF. Survey the seroprevalence of CMV among hemodialysis patients in Urmia, Iran. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2010;21: 363-367.
209. Behzad-Behbahani A, Ehsanipour F, Alborzi A, Nourani H, Ramzi M, Rasoli M. Qualitative detection of human cytomegalovirus DNA in the plasma of bone marrow transplant recipients: Value as a predictor of disease progression. *Exp Clin Transplant*. 2004;2: 196-200.
210. Ziyaeyan M, Sabahi F, Alborzi A, Mahboudi F, Kazemnejad A, Ramzi M, Moravej A, Jaber MM. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients by quantitative competitive PCR. *Exp Clin Transplant*. 2006;4(1): 470-474.
211. Handous I, Achour B, Marzouk M, Rouis S, Hazgui O, Brini I, Khelif A, Hannachi N, Boukadida J. Co-infections of human herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7 and EBV) in nontransplant acute leukemia patients undergoing chemotherapy. *Virology*. 2020;17: 37.
212. Gawad AA, Hashish M, Abaza A, El-Kayal A. Cytomegalovirus Immunoglobulin G Avidity Index among Blood Donors in Alexandria, Egypt. *Cent Eur J Public Health*. 2016;24: 314-320.

213. Zekri A-R,N, Mohamed WS, Samra MA, Sherif GM, El-Shehaby AMR, El-Sayed MH. Risk factors for cytomegalovirus, hepatitis B and C virus reactivation after bone marrow transplantation. *Transpl Immunol*. 2004;13: 305-311.
214. Loutfy SA, Abo-Shadi MA, Fawzy M, El-Wakil M, Metwally SA, Moneer MM, Fattah NF, Kassem S, Elgebaly A. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections and their clinical relevance in Egyptian leukemic pediatric patients. *Viol J*. 2017;14: 46.
215. Devasia AJ, Mammen S, Korula A, Abraham A, Fouzia NA, Lakshmi KM, Abraham AM, Srivastava A, Mathews V, George B. A Low Incidence of Cytomegalo Virus Infection Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Despite a High Seroprevalence. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2018;34: 636-642.
216. Azanan MS, Abdullah NK, Chua LL, Lum SH, Abdul Ghafar SS, Kamarulzaman A, Kamaruzzaman S, Lewin SR, Woo YL, Ariffin H, Rajasuriar R. Immunity in young adult survivors of childhood leukemia is similar to the elderly rather than age-matched controls: Role of cytomegalovirus. *Eur J Immunol*. 2016;6: 1715-1726.
217. Du J, Liu J, Gu J, Zhu P. HLA-DRB1\*09 Is Associated with Increased Incidence of Cytomegalovirus Infection and Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13: 1417-1421.

## ***Biografija autora***

---

Marko Janković je rođen 7. decembra 1987. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao 2006. godine, a diplomirao 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,48.

Specijalističke akademske studije iz oblasti Hematologije upisao je 2012. godine. Završni specijalistički akademski rad pod nazivom "*Hemofagocitna limfohistiocitoza u infektivnim bolestima*" odbranio je 2015. godine.

Specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije je upisao 2017. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Kao lekar je zaposlen na Klinici za infektivne i tropske bolesti od 2013. do 2015. godine. Od 2015. godine je volonter, a od 2016. godine saradnik u nastavi u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. U zvanje asistenta je prvi put izabran 2018, a potom i 2021. godine.

Doktorske studije iz oblasti Molekularne medicine upisao je 2015. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, pod mentorstvom profesora dr Tanje Jovanović.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Марко Јанковић**

Број индекса: **мм 01/15**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**"Повезаност инфекције и генотипова хуманог цитомегаловируса са клиничким испољавањима у болесника са хематолошким малигнитетима"**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 7. март 2022.

---

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: **Марко Јанковић**

Број индекса: **мм 01/15**

Студијски програм: **Молекуларна медицина**

Наслов рада: **"Повезаност инфекције и генотипова хуманог цитомегаловируса са клиничким испољавањима у болесника са хематолошким малигнитетима"**

Ментор: **Професор др Тања Јовановић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 7. март 2022.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**"Повезаност инфекције и генотипова хуманог цитомегаловируса са клиничким испољавањима у болесника са хематолошким малигнитетима"**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 7. март 2022.

---