

Pathogenesis and treatment of cytomegalovirus infections: an experimental study

Citation for published version (APA):

Stals, F. S. (1995). *Pathogenesis and treatment of cytomegalovirus infections: an experimental study*. Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1995

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

7

Summary and general discussion

Summary and general discussion

Cytomegalovirus (CMV) infection is ubiquitous in man and it mostly runs an asymptomatic course in the immunocompetent host. In contrast, during immunocompromised conditions severe disease develops with high rates of morbidity and mortality. The pathogenesis of disease is poorly understood and treatment of disease is limited. Therefore, we searched for an animal model in which the pathology of CMV infection resembles that in man and which is suitable for studies on the treatment of CMV infections.

In this thesis the use of the rat is described as a host system to CMV infections *in vivo*. Infection of rats with a rat specific CMV (RCMV Maastricht) results in asymptomatic infection in immunocompetent rats, whereas under immunocompromised conditions severe symptoms develop. Two infection models were developed: in the first model generalized CMV infection was induced in immunocompromised rats and in the second model interstitial lung disease (ILD) was induced in allogeneic bone marrow transplant (BMT) recipient rats. In both infection models the pathogenesis of disease was studied. Additionally, the effect of different treatment modalities was studied in the two models.

For induction of generalized infection animals were immunosuppressed by a sublethal challenge (5 Gray) of total body irradiation (TBI) and infected with RCMV. At eight days post infection (p.i.) a generalized RCMV infection developed with macroscopic and microscopic signs of splenitis, hepatitis and to a lesser extent pneumonia. Infection was also associated with haemostasis disorders. High virus titres were found in the spleen and liver and lower titres in the lung and kidney. The bone marrow was also heavily infected. Ultimately, most animals died from infection between eight and ten days p.i. The symptoms in these animals were similar to those in patients with severe immunological impairment such as AIDS patients, in whom involvement of the bone marrow is described and in perinatally infected new-borns, which suffer from hepatitis and splenitis. Thrombocytopenia and haemostasis disorders are also frequently described in neonates. The multiple bleedings found in the internal organs point into the direction of diffuse vascular coagulation and coagulopathy. A typical example of vascular involvement during CMV infection is CMV-induced retinitis in AIDS patients, that basically affects the vascular layer of the retina, the chorion. There is increasing evidence that CMV-infected endothelium becomes activated and ultimately loosens from the subendothelial layer, resulting in vascular leakage and haemostatic disorders. This led to the hypothesis that changes in the vascular endothelium forms the basis of CMV-induced disease.

Pneumonia is a serious complication of CMV infection in immunocompromised patients. In particular, ILD occurs frequently in allogeneic BMT recipients. In these patients ILD is associated with CMV infection and graft versus host disease (GvHD), and is thought to be an immunopathologic process. To study the pathogenesis of CMV-induced ILD, we developed a bone marrow transplantation (BMTx) model in rats. In this model, animals received potentially lethal total body irradiation (TBI), followed by replacement of the bone marrow and CMV infection. ILD occurred in rats which had received allogeneic BMTx and RCMV infection, but not in animals which had received syngeneic BMTx and RCMV infection nor

in mock-infected animals after allogeneic BMTx. Therefore, these studies clearly demonstrated that a combination of CMV infection and allogeneic BMTx is required for the development of ILD. However, these experiments did not allow a definitive answer to the question whether the occurrence of ILD in allogeneic, but not in syngeneic BMT recipients is due to differences in the host, such as homing of the bone marrow cells, or that it is based on immunological factors, such as differences in major histocompatibility complex (MHC) antigens of the lung. Therefore, we performed a series of experiments in which prior to allogeneic BMTx, an allogeneic lung was transplanted in the host. In this model the allogeneic bone marrow recognized the donor lung as syngeneic tissue and the recipient lung as allogeneic. After RCMV infection significantly more CMV antigen-expressing cells in the interstitial septa were found in the allogeneic recipient lung than in the syngeneic donor lung. The higher viral load in the septal wall of the lung was accompanied by severe diffuse ILD, characterized by congestion of the interstitial septa with mononuclear cells and erythrocytes, swelling of endothelial cells in the pulmonary capillaries and endothelial leakage. In contrast, in the donor lung that was syngeneic to the bone marrow, only minor changes were observed in the interstitial and in the capillary endothelium. It was concluded that a high virus load in the interstitium, as is detected in the recipient lung, is associated with interstitial and endothelial changes in the capillaries and interstitial congestion. The splenic weight of these animals was not increased and an inflammatory response in the perivascular and peribronchial region of the recipient lung was absent. It was therefore concluded that these CMV-induced interstitial changes in the allogeneic lung are not associated with GvHD. In order to evoke a strong immune response, additional lymphocytes, that were syngeneic to both the bone marrow and the donor lung, were administered. After lymphocyte donation, the cellular inflammatory response in the alveolar septa of the allogeneic lung was less than in the syngeneic lung. After RCMV infection this response was not increased. Since no signs of GvHD were observed in these experiments, it can be concluded that GvHD is not a prerequisite for the development of ILD in these acutely infected rats. In this study the first particular finding was the presence of vascular leakage and subsequent congestion of the interstitial septa in the lung, that occur in the absence of an inflammatory response. These changes are related to high local virus titres after allogeneic bone marrow transplantation. Therefore, we hypothesize that vascular activation and subsequent interstitial congestion are the primary pathological findings during CMV-induced ILD. This vascular activation is followed by an inflammatory response, rather than an aggressive local immune response to CMV as suggested by others. To rule out the possibility of a fulminant local T-cell response to CMV, adoptive transfer experiments can be performed. In these experiments the effect of T-cells primed with CMV proteins can be studied on the lungs of infected allogeneic BMT recipient rats. To exclude cross reactivity between RCMV antigens and allo-antigens, these experiments can be performed in noninfected rats. The second interesting observation was the presence of CMV-induced ILD in the absence of GvHD. This finding contrasts with data from other experiments describing a statistical relation between CMV infection, ILD and GvHD. In our hands it seemed that GvHD was even inhibited by the CMV infection. An explanation for these different findings can be the relation between GvHD and reactivation of latent CMV

infection, that confounds data in man: The combination of allogeneic transplantation and immunosuppression evokes the reactivation of latent CMV infection. This leads to the hypothesis that GvHD and subsequent immunological cell proliferation permit the virus to reactivate from a latent state. GvHD on turn has to be treated by high level immunosuppressive regimen, making escape from immune surveillance possible. Ultimately, this results in a generalized CMV infection in which the lung is often involved. To point out the relation between GvHD and CMV infection, studies on latency and reactivation have to be performed. Additionally, inbred animals with only minor genetical differences in their MHC molecules can be used to elucidate the role of MHC recognition with respect to CMV infection.

The second part of the study focused on the treatment of CMV disease. Two known treatment modalities are treatment with hyper immune serum (HIS) and treatment with antiviral drugs. Treatment of CMV infections with antiviral drugs, such as 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxy-methyl)guanine (DHPG or ganciclovir) is widely used. DHPG is a nucleotide analogue, that inhibits the viral DNA polymerase and that functions as a chain terminator. Treatment with DHPG seems to be effective for some patients with CMV infection, but severe adverse reactions limit the use of this drug. In particular in allogeneic BMT recipients suffering from CMV-induced ILD, therapy failure is described. Combination treatment of DHPG and HIS seems to be superior to treatment with either one of those.

The following questions were subject of the antiviral treatment studies in the rat model. What is the optimal therapeutic regimen and under which circumstances should combined treatment with ganciclovir and HIS be advised? Should the serum preparations used for treatment contain specific anti-CMV activity or can non-specific antibodies be used? Are there alternative antiviral agents which are effective against clinical CMV infections?

Studies were performed on HIS treatment in rats suffering from generalized RCMV infection. The HIS had high neutralizing antibody titres. The HIS administered early during infection (i.e. day 0) reduced mortality significantly and there was a dose effect relationship. HIS treatment reduced virus titres in many organs, such as the lungs and liver, but not in the spleen. When HIS treatment was delayed for three days it did not affect mortality and did not result in a decrease of virus titres in the internal organs. Treatment with control immune serum (CIS) had no effect on mortality, indicating that specific anti-CMV directed antibodies formed the basis of the effect on generalized CMV infection. Interestingly, variation in the virus titre in the inoculum did hardly influence the effect of HIS treatment. In contrast, increased immunosuppression from 5 to 6 Gray TBI abolished the antiviral effect of HIS. This suggests that, although antibodies against CMV act as neutralizing antibodies *in vivo*, cell dependent antibody actions such as antibody dependent cell toxicity may be of great importance for the recovery of virus infection. After allogeneic BMTx, treatment with HIS had a beneficial effect on the course of CMV-induced ILD and it reduced the CMV titres in the lung. CIS had no effect on virus titres and on the development of ILD.

Studies on the effect of DHPG treatment revealed that the drug was effective against generalized RCMV infection in a dose dependent manner. The effective dose was 20 mg/kg/day given in two daily doses for five days. At that dose, mortality was significantly

reduced and the virus titres in liver and lungs were significantly decreased. Shortening of the duration of treatment and delay of treatment for three days led to therapy failure and all animals died from infection. Toxicity was not observed at that dose. DHPG treatment in the allogeneic BMTx model led to a significant decrease of virus titres in the lung of these animals, but had almost no effect on ILD.

Combined treatment with DHPG and HIS was studied in both the generalized infection model and the ILD model. In the generalized infection model, the combined treatment was synergistic, since the effective dose of both ganciclovir and HIS during combined treatment was reduced to 25% of the effective dose for treatment with a single antiviral agent. In the BMTx model, combined treatment with DHPG and HIS reduced the virus titres in lung and spleen to below detection levels and ILD was totally prevented. Interestingly, treatment with both DHPG and CIS reduced the virus titres in lung and spleen only slightly, but markedly reduced ILD. Administration of CIS as a single drug had no effect on virus titres and ILD.

From these experiments it can be concluded that specific antibodies to CMV have an important antiviral effect during immunocompromised conditions. Since the effect of antiviral treatment is dependent on the degree of total body irradiation, we conclude that the antiviral effect has to be supported by the cellular immune response. It would be interesting to study the activity of HIS with respect to the endothelial activation, which might be important in the pathogenesis of CMV infection. In addition, it is worthwhile to study whether CMV-induced pathology can be prevented by inhibition of endothelial cell activation.

A recently designed nucleotide analogue, (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylpropoxymethyl)cytosine (HPMPC) was evaluated for the treatment of CMV infections *in vivo*. *In vitro*, HPMPC seems to be a candidate for the treatment of CMV infections, since the selectivity index (the ratio of cell toxic concentration and effective antiviral concentration) is 1400, which is 8 times higher than that of DHPG. The drug also has some other advantages over DHPG, such as the long intracellular half life of the active metabolites and the low grade of resistance *in vitro*. The selectivity index of HPMPC for RCMV was about 500. Therefore, the drug turned out to be also a selective inhibitor of RCMV infection. The *in vivo* antiviral activity of the drug against RCMV was assessed in the generalized infection model as well as in the ILD model. In the generalized infection model HPMPC was far more active than DHPG: the effective dose was 2 mg/kg given in a single dose as compared to DHPG, which had to be administered at a dose of 20 mg/kg/day twice daily for at least 5 days. One single administration of HPMPC at 20 mg/kg (which is 10 times the effective dose) completely inhibited viral replication in all organs. As was the case for DHPG, HPMPC administered as late as three days *p.i.* was not effective. Preventive administration with HPMPC, in contrast to DHPG, was effective in reducing mortality from generalized infection. Toxicity was not observed at this dose. These properties of HPMPC make the drug suitable for long term preventive treatment of CMV infections. After allogeneic BMTx, HPMPC at 20 mg/kg completely inhibited viral replication in organs, such as the spleen and lungs, and the development of ILD. This study indicates that HPMPC is a potential suitable drug for the treatment of CMV infections. Applications in man have to be studied.

Chapter 7

Finally, the pathogenesis of RCMV infections in rats shows striking similarities with that of human CMV in man, which underlines that the rat model may be important to increase the insight in the *in vivo* behaviour of CMV and its clinical consequences. The rat models developed in this study can also be helpful to design appropriate treatment modalities for CMV disease. However, more knowledge on the virus is necessary for detailed studies on the *in vivo* behaviour of CMV.

Samenvatting en algemene discussie

Cytomegalovirus (CMV) infecties komen bij de mens algemeen voor en het infectie beloop is meestal asymptomatisch bij mensen met een normale afweer. Onder omstandigheden, waarbij de immuniteit verminderd is, kunnen er echter ernstige infecties ontstaan, die frequent leiden tot het ontstaan van ernstige ziekte en die met een hoge mortaliteit gepaard gaan. De pathogenese van CMV infecties is grotendeels onbekend en de behandelingsmogelijkheden voor de ziekte zijn beperkt. Daarom zochten wij naar een diersysteem, waarbij de pathologie van CMV infecties grote gelijkenis vertoont met die van de mens en naar een model, dat geschikt is voor het bestuderen van de behandeling van deze infecties.

In dit proefschrift wordt gebruik gemaakt van de rat als gastheer systeem voor CMV infectie. Terwijl een infectie bij immuungecompromitteerde ratten met een rat-specifiek CMV (RCMV Maastricht) meestal in een asymptomatische infectie resulteert, leidt dit in immuungecompromitteerde ratten tot ernstige symptomen. Twee infectie modellen werden ontwikkeld in de rat. In het eerste model werd een gegeneraliseerde CMV infectie geïnduceerd in immuungecompromitteerde ratten. In het tweede model werd interstitiële long ziekte (ILD) geïnduceerd door CMV infectie in ratten, die een allogene beenmerg transplantatie hebben ontvangen. In beide infectie modellen werd de pathogenese van CMV-geïnduceerde ziekte onderzocht. Aansluitend werden in beide modellen diverse behandelingsstrategieën onderzocht.

Om gegeneraliseerde CMV infecties te bewerkstelligen kregen de dieren immuunsuppressie door middel van een subletale dosis (5 Gray) totale lichaamsbestraling en werden ze intraperitoneaal geïnfecteerd met RCMV. Op de achtste dag van de infectie ontwikkelde zich een gegeneraliseerde RCMV infectie met macroscopische en microscopische tekenen van splenitis, hepatitis en in mindere mate pneumonie. De infectie werd ook geassocieerd met bloedingsafwijkingen. Hoge virus titers werden gevonden in de milt en lever, terwijl lage titers gedetecteerd werden in de longen en nieren. Het beenmerg was ook zwaar geïnfecteerd. Uiteindelijk bezweken de meeste dieren tussen de achtste en de tiende dag van de infectie. De symptomen in deze dieren vertoonden sterke overeenkomst met symptomen, die in patiënten met ernstige immuun stoornissen worden aangetroffen, zoals patiënten met het verworven immunodeficiëntie syndroom (AIDS) en bij perinatale infecties die frequent gepaard gaan met hepatitis en splenitis, trombocytopenie en afwijkingen in de haemostasis. De massale bloedingen aangetroffen in de interne organen wijzen in de richting van diffuse intravasale stolling met een coagulopathie. Een typisch voorbeeld van een dergelijke aandoening is de CMV geïnduceerde retinitis bij AIDS patiënten, die feitelijk een aandoening van het vaatbed van de retina, de chorion, is. Er zijn aanwijzingen dat CMV-geïnfecteerd endotheel geactiveerd raakt en uiteindelijk loslaat van de subendotheliale laag, hetgeen resulteert in vaatlekkage en veranderingen in de haemostasis. Dit leidt tot de hypothese dat vaatveranderingen aan de basis kunnen staan van CMV geïnduceerde ziekte.

Een ernstige complicatie van CMV infectie bij immuungecompromitteerde patiënten, in het bijzonder na allogene beenmerg transplantatie (BMTx), is een interstitieel longbeeld (ILD). In deze patiënten groep wordt CMV-geïnduceerde ILD geassocieerd met graft versus host ziekte (GvHD). De pathogenese van ILD is grotendeels onbekend, maar wordt vanwege deze

associatie als een immunopathologisch proces geduid. Om de pathogenese van CMV geïnduceerde ILD te bestuderen ontwikkelden wij een BMTx model in de rat. In dit model kregen de dieren een potentieel letale dosis totale lichaamsbestraling, gevolg door terugplaatsing van beenmergcellen en CMV infectie. ILD kwam voor bij de ratten die zowel een allogene BMTx hadden gekregen en ook met CMV besmet waren, maar niet bij ratten die alléén een allogene BMTx hadden gekregen en ook niet bij ratten die een syngene BMTx gekregen hadden in combinatie met CMV infectie. Uit deze gegevens blijkt duidelijk dat de combinatie van allogene BMTx en CMV infectie nodig is voor het tot stand komen van ILD. De vraag of het voorkomen van CMV geïnduceerde ILD alleen na allogene BMTx, maar niet na syngene BMTx, te wijten is aan verschillen in de gastheer, b.v. de nesteling van de nieuwe beenmergcellen, of dat het verschil gebaseerd is op immunologische factoren, zoals het verschil tussen het weefseltype (MHC) van de long en de beenmergcellen, kan uit deze experimenten echter niet beantwoord worden. Derhalve werd een reeks experimenten verricht, waarin voorafgaand aan de allogene BMTx, in de gastheer een allogene long werd getransplanteerd. Dientengevolge wordt de donorlong door het allogene beenmerg als syngene herkend, en de long van de ontvanger als allogeen. Met deze experimenten kon worden aangetoond, dat de allogene long van de ontvanger significant meer CMV antigeen-bevattende cellen in het interstitium bevatte, dan in de voor het beenmerg syngene long. De grote hoeveelheid geïnfecteerde cellen in de alveolaire septa van de allogene long ging vergezeld met een ernstige diffuus verspreide ILD, die gekenmerkt werd door congestie van de interstitiële tussenschotten met mononucleaire cellen en erythrocyten, zwelling van het endotheel in de longcapillairen en lekkages van het endotheel. In de voor het beenmerg syngene long werden echter weinig veranderingen geobserveerd. Omdat er geen toename werd gevonden in het miltgewicht en er geen verhoogde mate van ontstekingsreactie waar genomen werd in de perivasculaire en peribronchiale regio werden deze interstitiële veranderingen in de allogene long niet in verband gebracht met het optreden van GvHD. Om een sterke immuunrespons op te wekken werden, additioneel aan de BMTx, lymfocyten toegediend, die voor het beenmerg en de donor long syngene waren. Na deze extra toediening van lymfocyten was de immuunrespons in de alveolaire septa van de allogene long minder dan in de syngene long. Na RCMV infectie nam deze immuunrespons niet toe. Omdat in deze experimenten geen tekenen van GvHD werden gezien, kan worden geconcludeerd dat GvHD geen voorwaarde is voor het tot stand komen van ILD in deze RCMV geïnfecteerde ratten. De vaatlekkage en de daaropvolgende congestie van de alveolaire septa in de long, in afwezigheid van een inflammatoire respons, is de eerste bijzondere vinding. Deze veranderingen worden geassocieerd met hoge lokale virus titers na allogene BMTx. Daarom is de hypothese ontstaan dat i.p.v. een agressieve lokale immuunrespons, de inflammatoire respons secundair is aan de vaatafwijkingen en de daaropvolgende schade. Om de mogelijkheid van een lokale fulminante immuunrespons te onderzoeken kunnen transfer experimenten verricht worden. Daarbij kan het effect van voor CMV gesensibiliseerde T-cellen op de long van CMV geïnfecteerde ontvangers van een allogene beenmerg transplantatie onderzocht worden. Om eventuele kruisreactie tussen CMV antigenen en allo-antigenen te onderzoeken kunnen gesensibiliseerde T-cellen aan niet geïnfecteerde dieren gegeven worden. De tweede interessante

bevinding is, in afwijking van de statistische relatie tussen CMV infectie ILD en GvHD bij de mens, het ontstaan van ILD in afwezigheid van GvHD. In onze experimenten lijkt het er zelfs op dat GvHD geremd wordt door de CMV infectie. Deze tegenstelling kan verklaard worden uit de relatie tussen GvHD en reactivatie van CMV vanuit een latente staat: Het is bekend dat de combinatie van allogene transplantatie en immuunsuppressie een reactivatie van een latente CMV infectie uitlokken. Dit leidt tot de aanname dat GvHD en de daarop volgende celproliferatie reactivatie vanuit latentie toestaan. Op haar beurt wordt GvHD behandeld met hoge doses immuunsuppressiva, waardoor ontsnapping uit de immunologische controle mogelijk wordt. Dit leidt tot een gegeneraliseerde CMV infectie, waarbij de long vaak betrokken is. Om de relatie tussen GvHD en CMV infectie verder te bestuderen, moeten studies naar latentie en reactivatie ondernomen worden. Aansluitend kunnen studies gedaan worden, waarbij ratten met kleine genetische verschillen in hun MHC moleculen gebruikt worden, teneinde de rol van de MHC gerespecteerde herkenning met betrekking tot CMV infecties te ontrafelen.

Het tweede deel van het proefschrift gaat over de behandeling van CMV infecties. Bij de mens bekende behandelingsmodaliteiten zijn behandeling met hyperimmuun serum (HIS) en antivirale chemotherapie. Het meest frequent gebruikte antivirale middel is 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (DHPG ofwel ganciclovir). DHPG is een nucleoside analoog, dat het viraal DNA polymerase remt en dat werkt door de verlenging van de DNA keten te beëindigen. Behandeling met DHPG lijkt effectief te zijn bij bepaalde groepen van patiënten met een CMV infectie, maar ernstige bijwerkingen beperken de bruikbaarheid van dit geneesmiddel. Therapeutisch falen is beschreven bij patiënten, die lijden aan een CMV geïnduceerde ILD na het krijgen van een allogene BMTx. Combinatie therapie met DHPG en HIS lijkt betere effecten te geven dan behandeling met één enkel middel.

De volgende vragen zijn onderwerp van studie in het rat model. Welke is de beste behandelingsstrategie is en wanneer moet combinatie therapie met ganciclovir en HIS gebruikt worden. Moet het gebruikte serum specifieke antilichamen tegen CMV moeten bevatten, of kunnen niet-specifieke antilichaam preparaten gebruikt worden? Zijn er alternatieve antivirale middelen voor de behandeling van CMV infecties?

Bestudeerd werd de behandeling van ratten met een gegeneraliseerde RCMV infectie, met HIS. Dit HIS bevatte hoge titers aan neutraliserende antilichamen. De toediening van HIS onmiddellijk na de infectie deed de mortaliteit significant afnemen en er was een dosis-effect relatie waarneembaar. Bovendien waren de virus titers na behandeling met HIS lager in verschillende organen, zoals de longen en de lever. Indien de behandeling met HIS echter met 3 dagen werd vertraagd, was er geen effect op de mortaliteit meer waar te nemen en werd er geen afname meer van de virus titers in de inwendige organen gevonden. Behandeling met controle immuun serum (CIS) had geen effect op de mortaliteit. Dit betekent dat specifiek tegen CMV-gerichte antilichamen de basis vormen voor het antivirale effect van HIS. Interessant was ook de waarneming dat het resultaat van de behandeling met HIS nauwelijks beïnvloed werd door variatie van de hoeveelheid infectieus virus in het inoculum. Een verhoging van de hoeveelheid totale lichaamsbestraling van 5 Gray tot 6 Gray deed de

antivirale werking van HIS echter volledig teniet. Dit suggereert dat, hoewel antilichamen gericht tegen CMV neutraliserend werken, cel-afhankelijke werking van antilichamen, zoals antilichaam afhankelijke cytotoxiciteit, een belangrijke rol spelen voor de herkenning van een virus infectie in vivo. Ook bij een allogene BMTx had de behandeling met HIS een gunstig effect op het beloop van CMV geïnduceerde ILD en werden de virustiters in de long verminderd. CIS had geen effect op de hoogte van de virustiters en op de ontwikkeling van ILD.

Studies naar het effect van DHPG toonden aan dat het middel effectief was voor de behandeling van gegeneraliseerde RCMV infectie op een dosis afhankelijke wijze. De effectieve dosis was 20 mg/kg/dag, gegeven in twee doses per dag gedurende 5 dagen. Bij deze dosering werd de mortaliteit significant verminderd en waren de virustiters in de lever en longen significant lager. Het verkorten van de behandelingsduur, of het met drie dagen uitstellen van de behandeling, leidde tot het falen van de therapie, met als resultaat dat alle dieren overleden ten gevolge van de infectie. Toxiciteit werd niet waargenomen bij de gebruikte doseringen.

In het allogene BMTx model leidde de behandeling met DHPG tot een significante afname van de virustiters in de longen, maar het effect op ILD was gering.

Gecombineerde behandeling met DHPG en HIS werd bestudeerd in zowel het gegeneraliseerde infectie model, als in het BMTx model. In het gegeneraliseerde infectie model had de combinatie van beide middelen een synergistische werking, daar de effectieve dosis van beide middelen gedurende de gecombineerde behandeling werd verminderd tot 25% van de effectieve dosis voor de behandeling met beide middelen afzonderlijk. In het BMTx model werden met combinatie therapie de virustiters in de milt en longen tot onder het detectie niveau gebracht en het optreden van ILD werd totaal voorkomen. Het was interessant te zien dat de combinatie van DHPG en CIS de virus titers in de milt en longen maar weinig beïnvloedde, maar dat de ILD aanmerkelijk verminderd was. Enkelvoudige behandeling met CIS had geen effect op de virus titers en het ontstaan van ILD.

Uit deze studies kan afgeleid worden dat specifieke antilichamen, gericht tegen CMV, inderdaad een belangrijk antiviraal effect hebben gedurende periodes van immuunsuppressie. Daar de dosis van totale lichaamsbestraling van invloed is op het effect van behandeling, wordt geconcludeerd dat het antiviraal effect ondersteund moet worden door de cellulair immuniteit. Met betrekking tot endotheelactivatie, waarvan wij verondersteld hebben dat het van belang is de pathogenese van CMV infectie, is het interessant om de activiteit van HIS te bestuderen. Verder is het van belang om de invloed van endotheelactivatie remmers te bestuderen.

Ten slotte werd een recent ontwikkelde nucleotide analoog, (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl)cytosine (HPMPC) voor de behandeling van CMV geëvalueerd. Uit in vitro gegevens bleek al, dat HPMPC een uitstekende kandidaat is voor de behandeling van CMV infecties, daar de selectiviteitsindex (de ratio van de cel-toxische concentratie en de effectieve antivirale concentratie) 1400 is, hetgeen acht maal groter is dan die van DHPG. Het middel heeft ook andere voordelen boven DHPG, zoals de lange intracellulaire halfwaardetijd van de actieve metabolieten en de geringe mate van resistentie vorming in vitro. De selectiviteitsindex van

HPMPC voor RCMV was ongeveer 500, hetgeen aangeeft, dat het middel ook een selectieve remmer is voor RCMV replicatie. Ook werd de antivirale activiteit van het middel in vivo onderzocht; dit gebeurde in beide infectiemodellen. In het gegeneraliseerde infectiemodel werd gevonden, dat HPMPC veel actiever was dan DHPG: de effectieve dosis was 2 mg/kg voor HPMPC, in een eenmalige toediening, terwijl DHPG, met een dosering van 20 mg/kg/dag verdeeld over twee dagelijkse dosis, gedurende 5 dagen moest worden toegediend. Een enkele dosis van 20 mg/kg HPMPC remde compleet de virale replicatie in alle organen. Zoals het geval was voor DHPG, was ook de behandeling met HPMPC op de derde dag na infectie niet effectief. In tegenstelling tot DHPG, was de preventieve behandeling met HPMPC echter wel effectief en was in staat om sterfte ten gevolge van gegeneraliseerde infectie te voorkomen. Toxiciteit werd niet waargenomen, ondanks de hoge doseringen. De eigenschappen van HPMPC maken het geschikt voor langdurige profylaxe van CMV infecties.

Na allogene BMTx remde HPMPC bij een dosis van 20 mg/kg de virale replicatie in organen, zoals de milt en longen volledig, en remde het de ontwikkeling van ILD. Uit de resultaten van dit onderzoek kan geconcludeerd worden, dat HPMPC een geschikt middel lijkt te zijn voor de behandeling van CMV infecties.

Tenslotte toont de pathogenese van RCMV infecties in de rat opvallende overeenkomst met die van humaan CMV bij de mens, hetgeen onderstreept dat het ratmodel geschikt is voor het verkrijgen van meer inzicht in het in vivo gedrag van CMV en de klinische consequenties daarvan. De hier ontwikkelde rat modellen kunnen ook een ondersteunende rol vervullen bij het ontwikkelen van geschikte behandelingsmodaliteiten voor CMV ziekte. Om dit te bereiken is echter meer kennis nodig over het virus, zodat meer gedetailleerde studies naar het in vivo gedrag van CMV verricht kan worden.