

**Víruskimutatás, és a Cocksackie-Adenovírus Receptor
expressziós vizsgálata szívtranszplantáción átesett
kardiomiopátiás betegek szívizomzatából**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Tátrai Enikő



Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Sótonyi Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati Bizottság elnöke: Prof. Dr. Nemes Attila, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati Bizottság tagjai: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Réz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. id. Hartyánszky István, Ph.D., egyetemi magántanár

Dr. Kiss András, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2011

Kisfiamnak, Marcellnek

1. BEVEZETŐ	7
1.1. MIOKARDITISZ.....	7
1.1.1. Vírusos miokarditisz.....	7
1.1.2. Miokarditisz diagnosztikája.....	10
1.1.2.1. Klinikai vizsgálatok.....	11
1.1.2.2. Szerológia	11
1.1.2.3. Endomiokardiális biopszia	12
1.1.2.3.1. Szöveti vizsgálatok	12
1.1.2.3.2. Molekuláris módszerek.....	13
1.2. KARDIOTRÓP VÍRUSOK JELLEMZÉSE	14
1.2.1. Enterovírusok	14
1.2.2. Adenovírusok	16
1.2.3. Herpeszvírusok	19
1.3. KARDIOMIOPÁTIÁK.....	21
1.3.1. Kardiomiopátiák osztályozása.....	21
1.3.1.1. Dilatatív CM.....	23
1.4. COXSACKIE-ADENOVÍRUS RECEPTOR.....	26
2. CÉLKITŰZÉSEK	30
3. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK	31
3.1. VÍRUSKIMUTATÁS ÉS SZÖVETI VIZSGÁLAT	31
3.1.1. Betegpopuláció	31
3.1.2. DNS izolálás	31
3.1.3. RNS izolálás	32
3.1.4. Vírus szekvencia kimutatás nested PCR alkalmazásával	32
3.1.4.1. Adenovírus 2, Adenovírus 3 és HHV6 vírus szekvenciák kimutatása ..	32
3.1.4.2. Enterovírus szekvencia kimutatása.....	34
3.1.5. Vírus-pozitív minták direkt szekvenálása	35
3.1.5. Hisztológiai vizsgálat	35
3.2. CAR EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATA ÉS A CAR EXONOK SEKVENÁLÁSA	36
3.2.1. CAR mRNS expressziós vizsgálata.....	36

3.2.2. CAR immunfluoreszcens vizsgálata.....	38
3.2.3. CAR gén exonjainak szekvenálása.....	38
4. EREDMÉNYEK	41
4.1. VÍRUSKIMUTATÁSSAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK.....	41
4.1.1. Víruskimutatás PCR-rel.....	41
4.1.2. Vírus-pozitív minták szekvenálása.....	43
4.1.3. Hisztológiai eredmények	45
4.2. CAR EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATÁNAK ÉS SEKVENÁLÁSÁNAK EREDMÉNYEI.....	46
4.2.1. CAR mRNS expressziós vizsgálata.....	46
4.2.2. CAR immunfluoreszcens vizsgálata.....	47
4.2.3. CAR exonok szekvenálása	50
5. MEGBESZÉLÉS	51
5.1. VÍRUSKIMUTATÁS.....	51
5.2. CAR EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATA	54
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	58
7.1. ÖSSZEFOGLALÁS	59
7.2. SUMMARY	60
8. IRODALOMJEGYZÉK	61
9. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ SAJÁT EREDETI KÖZLEMÉNYEK.....	82
10. TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK	83
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	84

Rövidítések jegyzéke

AdV	Adenovírus
AdV2	Adenovírus 2 szerotípus
AdV3	Adenovírus 3 szerotípus
AdV5	Adenovírus 5 szerotípus
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> , Antigén Prezentáló Sejt
ARVCM	<i>Arrhythmogen Right Ventricular Cardiomyopathy</i> , Aritmogén Jobb Kamrai Kardiomiopátia
BKAR	Bal Kamra Apikális Régió
BKEF	Bal Kamra Elülső Fal
BKHF	Bal Kamra Hátsó Fal
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Marha Szérum-albumin
CAR	<i>Coxsackie-Adenovirus Receptor</i> , Coxsackie-Adenovírus Receptor
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> , Differenciálódási Marker
CM	<i>Cardiomyopathia</i> , Kardiomiopátia
C _T	<i>Threshold Cycle</i>
CMV	Citomegalovírus
CTX	<i>Cortical thymocyte marker in Xenopus</i>
DAF	<i>Decay accelerating Factor</i> (CD55)
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i> , 4',6-Diamidino-2-Fenilindol
ddH ₂ O	<i>Double Distilled Water</i> , Kétszeresen Desztillált Víz
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i> , Dietilpirokarbonát
DNS	Deoxi-Ribonukleinsav
dNTP	Deoxinukleotid-Trifoszfát
dNTP mix	Deoxinukleotid-Trifoszfát Keverék
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i> , 1,4-Ditiotreitol
EBV	Epstein-Barr Vírus
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Etilén-diamin-tetraecetsav
EF	Ejekciós Frakció

EKG	Elektrokardiogramm
EMB	<i>Endomyocardial Biopsy</i> , Endomiokardiális Biopszia
EV	Enterovírus
HHV	Humán Herpeszvírus
HHV6	Human Herpeszvírus 6
HLA	Human Leukocita Antigén
IL	Interleukin
ICD	<i>Intercalated Disc</i> , Eberth-vonalak
IFN	Interferon
ISFC	International Society and Federation of Cardiology
JKEF	Jobb Kamra Elülső Fal
JKHF	Jobb Kamra Hátsó Fal
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i> , Mitogén-aktivált Protein Kináz
MC	<i>Myocarditis</i> , Miokarditisz
MHC I	<i>Major Histcompatibility Complex I</i> , Fő Hisztokompatibilitási Génkomplex I
mRNS	Hírvivő Ribonukleinsav
NK	<i>Natural Killer</i> , Természetes Ölősejt
NO	<i>Nitric Oxide</i> , Nitrogén-Monoxid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Foszfát-Pufferolt Sóoldat
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polimeráz Láncreakció
PTAH	<i>Phosphotungstic Acid-Haematoxylin</i> , Foszforwolframsavas-hematoxin
PVB19	Parvovírus B19
RD	Humán Embrionális Rabdomiosarkóma Sejtvonat
RNS	Ribonukleinsav
T4 sejtek	CD4+ T-limfociták
T8 sejtek	CD8+ T-limfociták
TNF	Tumor Nekrózis Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i> , Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezető

1.1. Miokarditisz

1.1.1. Vírusos miokarditisz

A miokarditisz (MC) a szívizomzat akut vagy krónikus gyulladásos folyamata, melynek a patofiziológiája nem teljesen tisztázott. Nehéz felismerhetőségének köszönhetően a diagnosztizálása is korlátokba ütközik.

A vírusos MC a gyermekkori és a felnőttkori megbetegedések és halálozások leggyakoribb oka (Bowles és mtsai 2003, Savon és mtsai 2008). A gyermekkori vírusos MC valós előfordulási gyakorisága ismeretlen, mivel az esetek egy részében tünetmentesen zajlik és ennek következtében észrevétlen marad a klinikusok előtt (Dettmeyer és mtsai 2004).

Az elmúlt években egyértelműen bebizonyosodott az enterovírusok (EV), azok közül is elsősorban a Coxsackie-B3 szerotípus szerepe MC-ben. Számos közlemény szól amellett, hogy az MC dilatatív kardiomiopátia (CM) kialakulásában is jelentőséggel bír (Martino és mtsai 1994), azonban ennek pontos patogenezise a mai napig ismeretlen. Akut vírusos MC-ből a betegek háromnegyed része spontán meggyógyul, míg a megmaradó rész esetében szívizombetegség alakul ki (Heymans 2007).

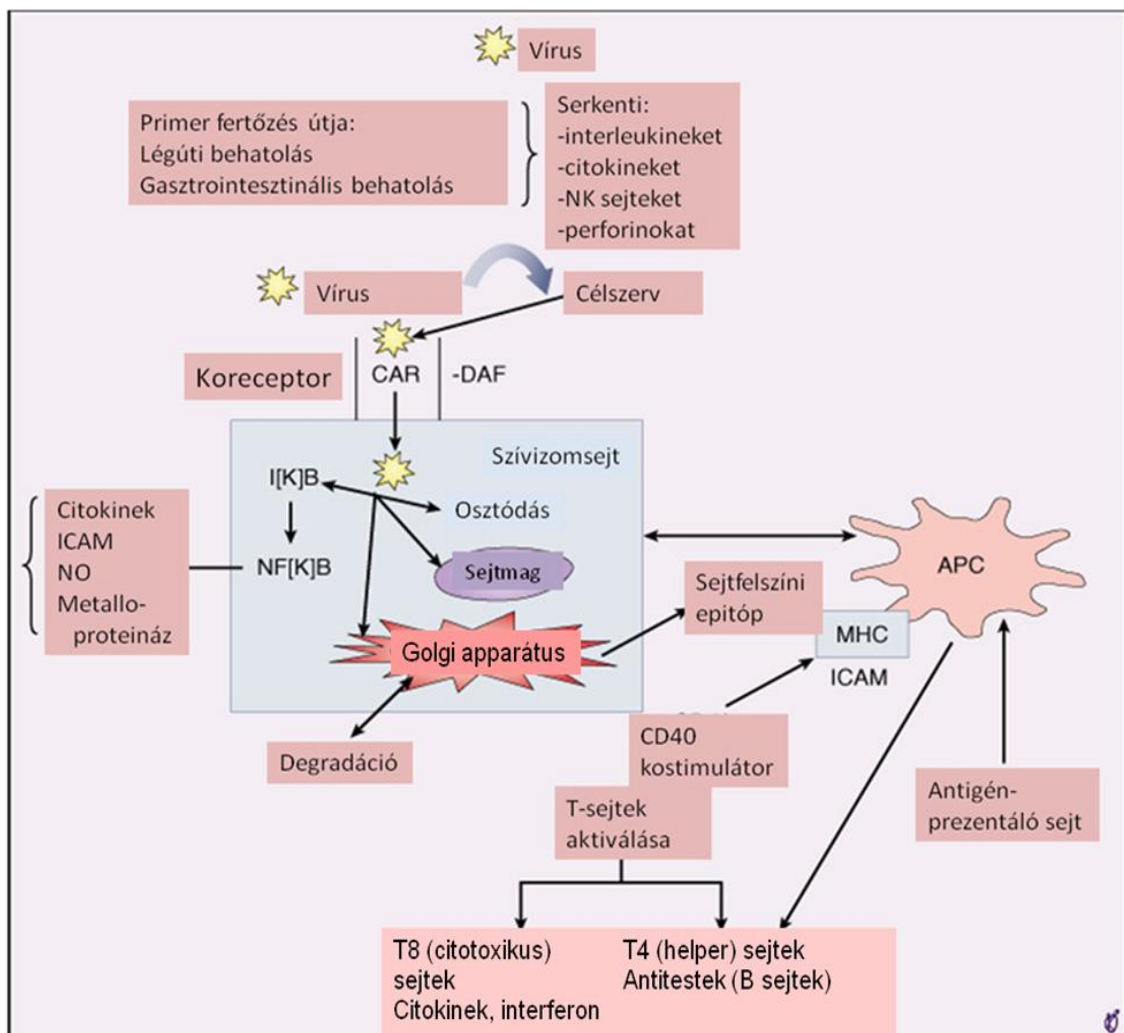
Az MC folyamata időrendi sorrendben három részre különíthető. Az első fázisban a vírus közvetítette lízis során a szívizomsejtek destrukciója figyelhető meg, melynek során megjelennek az immunsejtek első hullámát jelentő természetes ölősejtek (NK). Az NK sejtek a vírus szaporodását korlátozzák (Kearney és mtsai 2001). Ezt egy korábbi kísérlet támasztotta alá, melynek során NK deficiens egerekben sokkal súlyosabb lefolyású MC alakult ki (Lodge és mtsai 1987). Az NK sejtek interleukin-1-bétát (IL), tumornekrózis faktor-alfát (TNF), interferon-gammát (IFN) és IL-2-bétát termelnek, melyek előnyösen és hátrányosan is befolyásolhatják a szívizom működését (Matsumori 1997). Az előzőekhez hasonló módon viselkedik a nitrogén-monoxid (NO) is, mely szabályozza a szervezetkárosító immunfolyamatokat és szerepet játszik a fertőző ágens eliminálásában, azonban állatkísérletben autoimmun MC-ben citotoxikus

hatását figyelték meg (Ishiyama és mtsai 1997). A folyamat előrehaladtával a szívizomsejtek direkt pusztulása figyelhető meg (McManus és mtsai 1993). A kezdő fázis gyakran észrevétlenül marad, mivel a kezdeti károsodást az immunrendszer kivédi (McCarthy és mtsai 2000). A folyamat előrehaladtával jelennek meg az antigén prezentáló sejtek (APC) révén aktiválódott T-limfociták, melyek száma a vírus szervezetbe jutásától számítva 7-14. napon éri el a legmagasabb értéket (Kishimoto és mtsai 1985). A kezdő fázisban a kialakult celluláris és humorális immunválasz javíthat a folyamat kimenetelén, ugyanakkor a második fázisban felelős lehet a károsodásért, melyet részben a molekuláris mimikri eredményez (Lawson 2000), mely a vírus és szív eredetű epitópok hasonlóságán alapul (Badorff és Knowlton 2004). Az autoimmun folyamatok kialakulásáért felelős lehet egyrészt az autoantigénnel keresztreakáló ellenanyagok (Caforio és mtsai 2002), másrészt a vírus indukálta szívizomsejt-károsodás eredményeként felszabaduló intracelluláris szívizomfehérjék jelenléte (Dennert és mtsai 2008). A folyamat során a gyulladásos sejtek által termelt mátrixbontó fehérjék is megjelennek (Pauschinger és mtsai 2004, Heymans és mtsai 2006) **(1.1.1a. ábra)**. A harmadik fázist a szívizom károsodás következtében kialakuló fibrózis, balkamra dilatáció jellemzi (Sivasubramanian és mtsai 2001), melyek a szív funkcióképtelen állapotához vezetnek (Heymans 2006).

Az eddigi vizsgálati eredményekkel kapcsolatban két megmagyarázatlan jelenséget figyeltek meg. Egyrészt akut MC esetében napok alatt lezajlott a gyógyulási folyamat és hosszú távon jobb prognózissal rendelkeztek a betegek összehasonlítva a krónikus MC-ben szenvedőkkel, akiknél rosszabb prognózist figyeltek meg (dilatatív CM manifesztálódott) (Mason és mtsai 1995, McCarthy és mtsai 2000). Másrészt felvetődött az a kérdés, vajon mi lehet az oka annak, hogy csak bizonyos betegekben alakul ki MC.

A molekuláris technikáknak köszönhetően napjainkra már több vírustípust detektáltak szívizomban, mely szereppel bírhat MC és dilatatív CM kialakulásában. A Cocksackie vírusokról régóta ismert, hogy szívizom gyulladásának kialakulásában fontos szerepet játszanak. Az elmúlt években azonban egyre gyakrabban detektáltak Adenovírus (AdV), Human Herpesz Vírus 6 (HHV6) és Parvovirus B19 szekvenciákat kóros állapotú szívizomban. A kardiotrop vírusok (EV, AdV, HHV6, PVB19) többnyire felső légúti panaszokat előidéző kórokozók, azonban bizonyos esetekben komolyabb

klinikai tüneteket is képesek generálni. Az emberek közel 90 %-a átesik ezeken a vírusfertőzéseken az élete során anélkül, hogy bármilyen szövődményt eredményeznének a szívben (Dennert és mtsai 2008). A különböző vírusok fertőzőképességét pozitívan befolyásolja a gazdaszervezet alultápláltsága (Woodruff 1980), az előrehaladott kora (Grodums és mtsai 1959) és a mozgásszegény életmódja (Gatmaitan és mtsai 1970). A legnagyobb rizikófaktor azonban az adott személy immunrendszerének állapota jelentheti, amennyiben a behatoló víruspartikulumot a gazdaszervezet nem képes eliminálni az immunrendszer valamilyen hibájából fakadóan. Ezáltal megnőhet a kockázat krónikus MC kialakulására, mely dilatatív CM-hez vezethet.



1.1.1a. ábra: Vírus infekció folyamata.

(Forrás: Baughman és Wynne 2005)

Több korábbi próbálkozás az MC immunszuppresszív terápiával történő kezelése kapcsán igen ellentmondó eredményeket adott. Egyedül egy 102 betegen elvégzett vizsgálatban sikerült immunszuppresszív kezeléssel a bal kamra funkciójának javulását előidézni azokban a betegekben, ahol a szívizomban gyulladás fennállása egyértelműen igazolható volt szövettani vizsgálattal (Parrillo és mtsai 1989). Egy 2003-as tanulmányban az alkalmazott immunszuppresszív terápiában részesült MC-s betegek közül a kezelésre nem reagálók többsége EV pozitivitást mutatott, továbbá a kezelés ideje alatt szívizomsejt-károsodást figyeltek meg (Frustaci és mtsai). Napjainkra nyilvánvalóvá vált az immunszuppresszív kezelés hatástalansága vírusos MC kezelésében. A jelenlegi álláspont szerint az IFN kezelés elfogadhatóbb terápiának tűnik a vírusok eliminálására. Egy 2003-ban végzett felmérésben 6 hónapos IFN-béta kezelés hatására mind az AdV, mind az EV genom eliminálódott a szívizomból, melynek hatására javult a vérkeringés és a szívizomban lévő T-limfociták száma is lecsökkent (Kühl és mtsai 2003).

IFN-alfa és IFN-béta a vírusellenes immunválasz szerves részei, melynek során szabályozzák az antigén feldolgozását és bemutatását MHC I molekulák révén, továbbá aktiválják a T-sejtek és a CD8+ memória T-sejtek proliferációját (Biron 1999). Az IFN-gamma megakadályozza a vírus replikációját, azonban negatív hatását is demonstrálták, miszerint súlyosbít néhány Th1 közvetített autoimmun betegséget. Korábban megfigyelték, hogy az IFN-gamma védelmet jelent a krónikus fibrózis kialakulásával szemben, mivel gátolja a fibroblasztok kialakulását (Oldroyd és mtsai 1999). Cocksackie-B3 vírussal fertőzött IFN-gamma deficiens egerekben jelentősen megnőtt a krónikus MC és fibrózis kialakulása, továbbá mind a vad, mind az IFN-gamma deficiens egerekben dilatatív CM alakult ki kamramegnagyobbodással, azonban IFN-gamma deficiens egerekben súlyosabb formában volt detektálható a kórfolyamat (Fairweather és mtsai 2004).

1.1.2. Miokarditisz diagnosztikája

Az MC diagnosztikája tekinthető az egyik legnagyobb kihívásnak a kardiológiában. Megkülönböztetünk idiopátiás, bakteriális, vírusos és/vagy autoimmun eredetű MC-t (Richardson és mtsai 1996, Angelini és mtsai 2002).

Az MC az esetek egy részében felderítetlen marad, míg másik részében influenzaszerű tünetek jelentkeznek felső légúti vagy gyomor-bélrendszeri panaszok formájában (Dennert és mtsai 2008). Feltehetően az immunrendszer nem megfelelő működése eredményezheti, hogy az adott vírus nem eliminálódik a szervezetből, így lehetősége nyílik a vérkeringés útján más szervekbe eljutnia és megtelepednie. A kardiális tünetek napokkal vagy hetekkel a vírusfertőzést követően jelentkeznek, melyeket fáradtság, nehézlégzés, szívremegés, rossz közérzet és atípusos mellkasi diszkomfort érzés jellemez (Dec és mtsai 1985).

1.1.2.1. Klinikai vizsgálatok

Akut MC gyanúja esetében gyakori eset, hogy az elektrokardiogram (EKG) abnormális képet mutat, következésképpen a technika érzékenysége az eddigi eredmények alapján közel 47 %-ra tehető (Dennert és mtsai 2008). A vizsgálat specifitása azonban teljesen ismeretlen (Liu és Yan 2005). Akut MC esetében előfordulhat ismeretlen eredetű pitvari vagy kamrai aritmia, az EKG görbén látható PQ szakasz megrövidülése és diffúzan emelkedett ST-T szakasz, mely utóbbi átmehet depresszált ST-T szakaszba (Wang és mtsai 2003).

1.1.2.2. Szerológia

A vírus szerológia napjainkra már elavult technikának tekinthető, köszönhetően az alacsony érzékenységének és specifitásának (Baughman 2006), hiszen bizonyos személyeknél hosszabb ideig fennáll az ellenanyag termelés (Baboonian és Treasure 1997). A kardiális tünetek mellett észlelt alacsony IgG, megemelkedett IgM és IgA ellenanyagok utaltak vírus eredetre, azonban a szív vírusfertőzöttségét nem igazolta a vizsgálat (Dennert és mtsai 2008). A kontroll csoportban 4-10 %-os arányban jelezte infekció meglétét a szerológiai vizsgálat (Baboonian és Treasure 1997).

1.1.2.3. Endomiokardiális biopszia

Az American College of Cardiology /American Heart Association (ACC/AHA) javaslata szerint a klinikus az EMB-n elvégzett szövettani vizsgálat eredménye alapján hozhat döntést a megfelelő terápia kiválasztása céljából (Hunt és mtsai 2001, Cooper és mtsai 2007). Indokoltnak tekinthető az a szemlélet, miszerint a klinikusok MC gyanúja esetében maximum 2 napot várnak az EMB elvégzése előtt (Dennert és mtsai 2008). Ezt támasztja alá azon esetek száma, melyeknél spontán javulás figyelhető meg, így elkerülhető az indokolatlanul elvégzendő invazív mintavételi eljárás. Létezik azonban egy másik álláspont is, miszerint minden egyes MC-gyanús esetben elvégzendő az EMB. Ezt azzal indokolják, hogy a betegség korai fázisában nagyobb a diagnosztikai vizsgálat érzékenysége. Ismert etiológiájú megbetegedés kezelése nagyságrendekkel hatékonyabb a korai fázisban, mint a már meglévő gyulladásból fakadó helyrehozhatatlan károsodás esetében (Dennert és mtsai 2008). Ennek tisztázásában pillanatnyilag az EMB bír a legnagyobb szereppel, mely elsősorban szövettani, másodsorban molekuláris (*in situ* hibridizáció, PCR) és immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzését teszi lehetővé.

1.1.2.3.1. Szövettani vizsgálatok

Az MC-ben szenvedő betegek esetében elvégzett szövettani vizsgálatok kiértékelése a Dallas-kritériumok alapján történik (Aretz 1987). A Dallas-kritériumoknak azonban számos hátránya van:

- 1) eltérő patológiai értelmezést eredményezhet (Shanes és mtsai 1987)
- 2) a mintavételezési hiba kiküszöbölése körülményes (Hauck és mtsai 1989)
- 3) figyelmen kívül hagyja a patológiai eltérés okát (Heymans 2007, Dennert és mtsai 2008).

A diagnózis felállításában meghatározó a szövettani mintában gyulladásos infiltrátumok jelenléte, továbbá nekrosis előfordulása. Szívizomsejt-nekrosis hiánya szórványos gyulladásos infiltrátum meglétével együtt határesetet jelent az MC diagnosztizálásában (Dennert és mtsai 2008).

A mintavételezési hely a jelenlegi gyakorlat szerint a jobb kamra szeptális területe. Ezzel kapcsolatban azonban két kérdés is felmerül: 1) a vírus kimutathatóság mutat-e fokális képet (térbeli variabilitás), 2) az EMB kivitelezésének időpontjaiban való eltérés mutat-e a kiértékelésnél különbséget a korábbi eredményekhez képest (időbeli variabilitás) (Hauck és mtsai 1989).

A szövettani vizsgálat mellett érdemes elvégezni immunhisztokémiai vizsgálatot is, mellyel lehetővé válik az inflammatorikus sejtek kvantifikálása, azonosítása és differenciáltsági fokának meghatározása, különös tekintettel a T-limfocitákra (Noutsias és mtsai 2002).

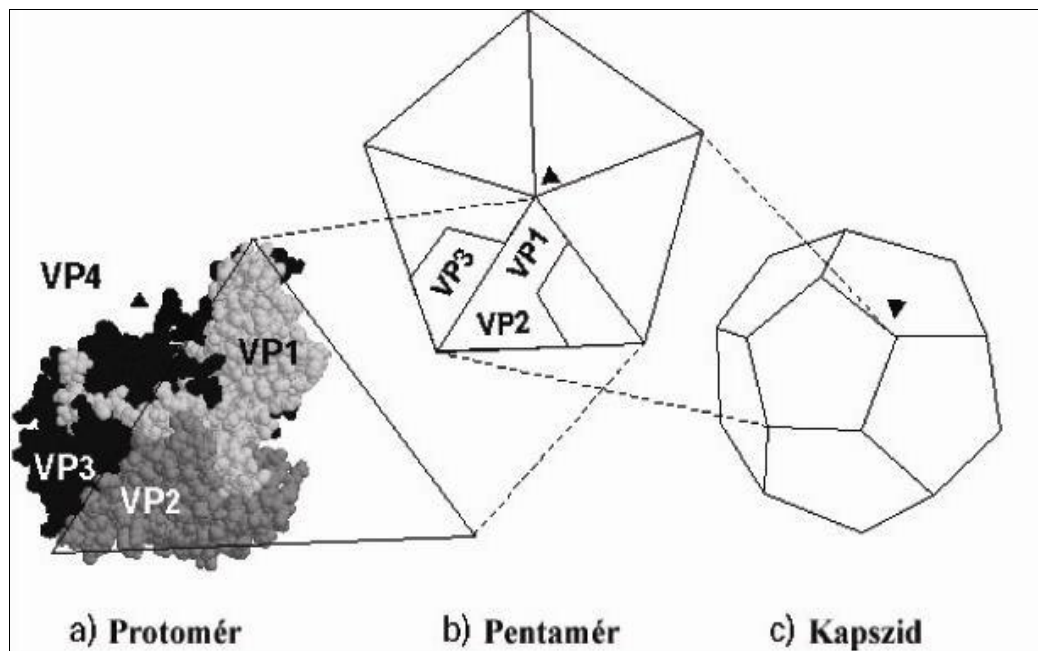
1.1.2.3.2. Molekuláris módszerek

A molekuláris módszerek alkalmazásával (PCR, *in situ* hibridizáció) számos vírusról bizonyosodott be, hogy szívizomban is detektálható. A PCR módszer rendkívül gyors és igen érzékeny technikának számít (Ross és Chien 1989). A legújabb vizsgálatok eredményei a PVB19 (34,7 %) és HHV6 (8,2 %) (Kühl és mtsai 2005) vírus szívizomban való magas előfordulási gyakoriságára derítettek fényt (Marholdt és mtsai 2006). Hasonló arányban fordultak elő a fenti vírus szekvenciák mind MC-ben, mind dilatatív CM-ben, alátámasztva annak lehetőségét, hogy vírus infekció generálta a szívizomkárosodást és annak funkcióképtelen állapotát. Korábbi közleményekben különböző hibridizációs technikával jelentősen eltérő arányban (18-50 %) sikerült EV szekvenciát kimutatni (Bowles és mtsai 1986, Archard és mtsai 1987, Easton és Eglin 1988, Tracy és mtsai 1990). Az eltérés oka lehet az, hogy a betegek klinikai szempontból való elkülönítése és csoportosítása nem egységes, továbbá a technikák érzékenysége sem egyforma a különböző esetekben.

1.2. Kardiotróp vírusok jellemzése

1.2.1. Enterovírusok

A Picornavírusok közé tartozó EV-k szerkezetére jellemző, hogy 60 darab ötszögű kapszomerből állnak (**1.2.1a. ábra**). A genetikai örökítőanyag duplaszálú RNS.



1.2.1a. ábra: Picornavírusok szerkezete.

(Forrás: Rueckert RR 1996)

Az EV-k csoportján belül megkülönböztetünk Polio-, nem-poliovírusokat, Coxsackie vírusokat, EV 68-71 típusokat, továbbá az Echovírusokat.

Cseppfertőzéssel vagy székletkenődéssel terjednek, és elsősorban a légző-, és gasztrointesztinális szervekben, szövetekben szaporodnak, majd a vérárammal jutnak el távolabbi célszervekbe. Az EV fertőzésekre általánosságban jellemző, hogy az esetek jelentős részében tünetmentesen vagy aspecifikus tünetek jelenléte mellett zajlanak le (Roivainen és mtsai 1998).

Az EV-k replikációját a zárt hurok modellel illusztrálják, melynek során háromféle RNS-alak képződik: 1) replikatív forma (duplaszálú RNS), 2) replikatív köztes alak (negatív szálú RNS), amely részlegesen hibridizál a pozitív RNS szállal, 3) újonnan szintetizált pozitív egyszálú RNS. Az újonnan szintetizált pozitív szál 5' végén

egy jellegzetes lóhere szerkezet alakul ki (Gamarnik és mtsai 2000), mely kölcsönhatásba lép az RNS 3' végén található poliA-farokkal, aminek következtében a genom körbe záródik, és a translációt a negatív szál szintézise váltja fel (Borman és mtsai 2002, Steil és mtsai 2008). A fentiekből következik, hogy a negatív szál detektálása a vírus aktív replikációjára utal (Pauschinger és mtsai 1999).

Egy tanulmányban EV negatív szálát detektáltak végstádiumú idiopátiás CM-es betegek szívizomzatában (Fujioka és mtsai, 2000). Egy nemrégiben megjelent tanulmány arról számolt be, hogy a vizsgált beteg populáció több mint 50 %-ában EV negatív szálát találtak, azonban nem mutatkozott különbség a szívizom gyulladásának mértékében a vírus-negatív betegek eredményével összehasonlítva (Kuethé és mtsai 2007). Ezt már egy korábbi közleményben is megfigyelték, ahol az inflammatorikus sejtek mennyisége nem mutatott összefüggést az EV replikációs állapotával (Pauschinger és mtsai 1999).

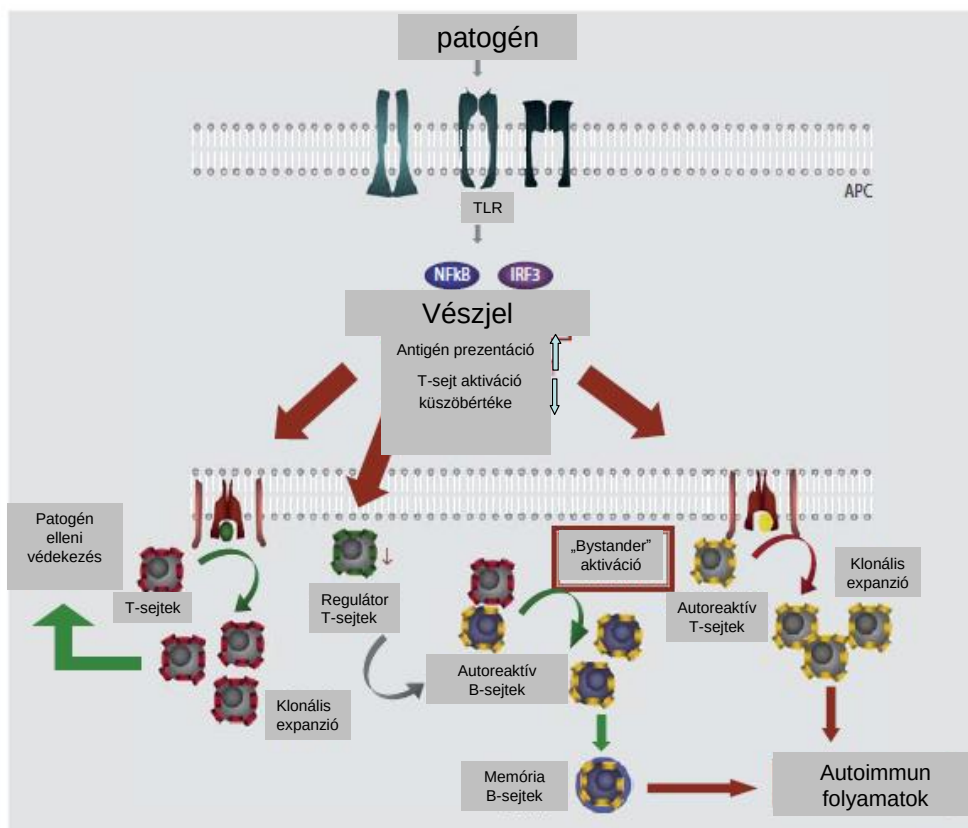
Először 1956-ban jelent meg közlemény, melyben fatális kimenetelű MC-s újszülöttek szérumában Coxsackie-B4 vírus antitestet detektáltak (Van Creveld és DeJager 1956). Azóta számos tanulmányban mutattak ki MC és dilatatív CM esetben elvégzett EMB során EV vírus szekvenciákat (Bowles és mtsai 1986, Pauschinger és mtsai 1999), melyek az EV vírusok betegség indukációjában való jelentőségét látszanak alátámasztani. Az EV előfordulását és kimutathatóságát több tényező befolyásolhatja: 1) a betegek közötti demográfiai különbségek; 2) a betegség állapota; 3) a vírusdetektálási metodikák közötti eltérések (Fujioka és mtsai 2000).

A szívizomzatot érintő akut EV infekció krónikus MC-hez, vagy dilatatív CM-hez vezethet, de előidézhethet súlyos szívritmuszavart és hirtelen szívhalált is (Baboonian és Treasure 1997). Coxsackie vírusfertőzés egerekben dilatatív CM-re jellemző szövettani elváltozásokat (Kutaura 1981), hörcsögökben szívmegegyesülést idézett elő (Morita 1981). Egy későbbi egereken végzett tanulmányban a Coxsackie vírusok képesek voltak a szívizomsejtek lízisét előidézni (Chow és mtsai 1992).

Egerekben nagyobb valószínűséggel manifesztálódott MC CD4⁺ T-sejtek hiányában, miközben a citotoxikus CD8⁺ T-sejtek hiánya hosszabb túlélést eredményezett és csökkent az MC előfordulása (Henke és mtsai 1995). Mutáns Coxsackie B3 vírus konstrukció folyamatos expresszáásával a szívizomban fibrózist és

szívizomsejt degenerációt figyeltek meg, mely dilatatív CM képére utalt (Wessely és mtsai 1998).

Egy 1990-es tanulmányban keresztreakciót figyeltek meg a Coxsackie vírus B4-et neutralizáló antitest és a szívizom miozin fehérjemolekulája között (Beisel és mtsai 1990). Egy korábbi vizsgálatban miozin ellenes antitestet egerekbe oltva autoimmun MC-t idéztek elő (Liao és mtsai 1995), továbbá egerekben a szív troponin I ellenes monoklonális ellenanyag szívizom dilatációt és funkcióképtelen állapotot eredményezett (Okazaki és mtsai 2003). Ezek a kísérleti eredmények az autoimmun folyamatok jelentőségére utalnak (**1.2.1b. ábra**).



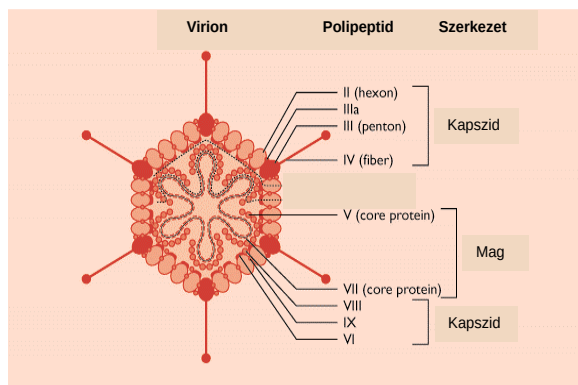
1.2.1b. Autoimmun folyamatok kialakulásához vezető útvonalak.

(Forrás: Kallwellis-Opara és mtsai 2007)

1.2.2. Adenovírusok

Az AdV-k duplaszálú, lineáris DNS vírusok. Az ikozaéder alakú AdV-k fehérjeburkát 252 darab morfológiai egység (kapszomer) alkotja, melyekből 240 hexon és 12 penton fehérje. A penton fehérjékhez rögzítve találhatók a fiber molekulák (**1.2.2a. ábra**).

Az AdV típusokra jellemző, hogy döntő többségben légzőszervi és gasztrointesztinális panaszokat idéznek elő, elsősorban gyerekkorban (Mitchell és mtsai 2000). Az 51 féle AdV hét csoportba tartozik, melyeket A-tól F-ig terjedő jelzéssel láttak el (Wadell 1984). Ezek közül elsősorban a C fajba tartozó 1-es, 2-es és 5-ös szerotípusok, továbbá a B1 fajba tartozó 3-as szerotípus játszik szerepet a járványszerű respiratorikus fertőzésekben (Mitchell és mtsai 2000).



1.2.2a. ábra: Adenovírusok szerkezete.

(Forrás: Berencsi és mtsai 2004)

Az AdV-k által előidézett fertőzések tünetei között szerepel a nátha, köhögés, továbbá a közérzetet negatívan befolyásoló nem-specifikus tünetek, mint a fejfájás, láz, hidegrázás és izomfájdalom. A vírusfertőzés kimenetele függhet attól, hogy a beteg milyen AdV szerotípussal érintkezett életében először (Smith és mtsai 1998). Amennyiben a vírus DNS kimutatható vérből és a mukózáls limfocitákból, feltételezhető, hogy maga a vírus képes a szívizomsejteket is megfertőzni a véráram révén, azonban ennek valódi mechanizmusa ismeretlen (Savon és mtsai 2008).

Vektorként való alkalmazásuk abból ered, hogy igen hatékony módon képesek termelni a genomjukban kódolt fehérjéket. A DNS molekula mindkét szála rendelkezik kódoló régióval. A gének elhelyezkedése alapján elkülöníthetünk korai, késői és átmeneti géneket. Az AdV-k replikációs ciklusát két fázisra osztják: 1) korai fázisban történik a vírus-sejt kapcsolat kialakulása, az adszorpció, a penetráció, a vírusgenom szabaddá válása és a gazdasejt magjába jutása, továbbá a korai gének kifejeződése; 2) késői fázisban kerül sor a DNS osztódására és a késői gének átíródására (Berencsi és mtsai 2004).

AdV-k a gyermekek 17-39 %-ában tehetők felelőssé MC kialakulásában (Berkovich és mtsai 1968, Martin és mtsai 1994, Shimizu és mtsai 1995, Calabrese és mtsai 2002), és dilatatív CM-es gyermekekben is igen gyakran detektálják őket (Griffin és mtsai 1995, Lozinski és mtsai 1994). Az eddigi megfigyelések szerint 5. életévet megelőzően majdnem minden gyermek átesik legalább egyfajta AdV fertőzésen (Baboonian és McKenna W 2003). Az AdV C típus előfordulási aránya humán limfocitákban a gyermekek 2. életévének végére a legnagyobb (Garnett és mtsai 2002). Egy tanulmány során megfigyelték, hogy 5 éves kor alatti gyermekeknél a vírusfertőzést követően megnövekszik az MC kialakulására való hajlam (Bowles és mtsai 2003).

Akut MC-ben szenvedő gyermekeknél a gyulladásos infiltrátumok kisebb mértékben fordultak elő AdV-pozitív esetekben, mint EV-pozitív esetekben (Martin és mtsai 1994).

1958-ban számoltak be 23 AdV okozta tüdőgyulladásos esetről, melyből 8 halálos kimenetellel végződött, két esetben MC manifestálódott (Charny és mtsai 1958). Egy 11 hónapos gyermek esetében AdV21 típushoz kapcsolódó MC-ről és intersticiális tüdőgyulladásról számoltak be (Henson és Mufson 1971).

Korábbi vizsgálatok rávilágítottak az AdV-k méhen belüli magzatban szívbetegség előidézésében való lehetséges szerepére (Towbin és mtsai 1994, Van den Veyver és mtsai 1998).

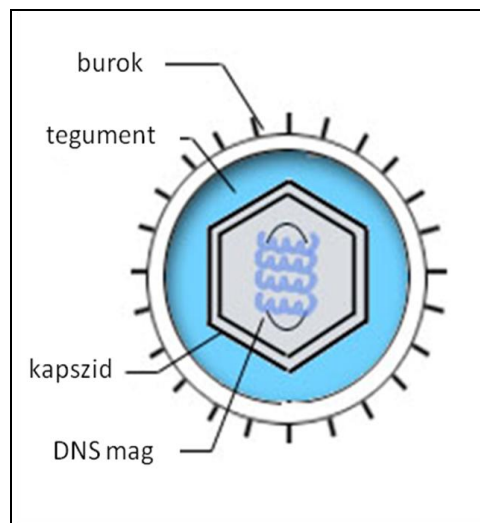
Az AdV-k számos immunválaszt befolyásoló stratégiával rendelkeznek, mely lehetővé teszi számukra a gazdaszervezet immunválasza alól való kibújást (Hayder és Müllbacher 1996). Az E3 régió által kódolt fehérjék a TNF közvetítette lízissel szemben védik meg a vírussal fertőzött sejteket (Gooding és mtsai 1988), továbbá a citolitikus T limfociták által történő lízist is gátolják a human leukocita antigének (HLA) közé tartozó fő hisztokompatibilitási génkomplex I (MHC I) expresszió mértékének csökkentésével (Burgert és mtsai 1987). Az AdV-k E1A régiójának fehérjéi elősegítik az apoptózis indukcióját (White 1993), és gátolják a limfocita aktiválást elősegítő IL-6 expresszióját (Janaswami és mtsai 1992). Dilatatív CM-ben és MC-ben is észleltek apoptotikus sejteket a szívizomban (Bowles és mtsai 1997).

Az AdV-k nagy részének gazdaszövetbe jutásában a Coxsackie-Adenovírus Receptor (CAR) játszik szerepet, azonban a B fajba tartozó AdV-k más receptort használnak. Egy korábbi tanulmányban a CD46 molekula bizonyult az AdV B 11, 16,

21, 35 és 50 szerotípusok esetében receptornak, azonban a 3, 7 és 14 szerotípusoknak más lehet a receptora (Tuve és mtsai 2006). A legújabb eredmények arra vezettek, hogy feltehetően egy új nem-CD46 receptorhoz kötődő infekciós útvonal is létezik, melyben a heparán-szulfát molekuláknak tulajdonítanak koreceptor szerepet (Tuve és mtsai 2008).

1.2.3. Herpeszvírusok

A Herpeszvírusok (HHV) családjába tartozó vírusok DNS vírusok, melyek közül 8 humánpatogén. Ebbe a családba tartozik az Epstein-Barr Vírus és a Citomegalovírus is. A HHV-k látens és lítikus módon is képesek fertőzést előidézni. Felépítésükre jellemző az ikozaéder kapszid, melyet kívülről egy fehérjeréteg és egy kétrétegű lipidmembrán vesz körül (1.2.3a. ábra). A kapszidon belül található a lineáris, duplaszálú DNS közel 100-200 gént kódoló régiókkal. A virionok átmérője 160-200 nm között mozog (Krueger és Ablashi 2003).



1.2.3a. ábra: Herpeszvírusok szerkezete.

A látens fertőzés során bizonyos behatásokra, mint láz, UV fény, fizikai terhelés, emocionális vagy hormonális hatások, terhesség, a herpeszvírus megtelepedésének helyéről reaktiválódik. Ennek egy közismert formája az ajakherpesz kiújulása.

Dilatatív CM-es gyermekek explantált szívében gyakori előfordulása HHV6 B genom esetében folyamatosan alacsony vírustermelést figyeltek meg, mely a látens fertőzés valószínűségét veti fel (Comar és mtsai 2009).

A HHV6A és B variáns a genom szempontjából nagyfokú homológiát mutat, azonban az eddigi eredmények és megfigyelések azt sugallják, hogy eltérő a két variáns biológiai viselkedése (Clark 2000). Mind a HHV6A, mind a HHV6B vírus képes megfertőzni az emberi T limfocita sejtvonalakat (Krueger és Ablashi 2003), továbbá monocitákban és makrofágokban is kimutatták a jelenlétüket (Braun és mtsai 1997, Clark 2000).

A HHV6 szempontjából különösen az endotél sejtek tekinthetők a fertőzés célpontjainak (Caruso és mtsai 2002). HHV6 endotéliumban való aktív replikációját humán endotélium sejtkultúrákban demonstrálták (Caruso és mtsai 2003, Grivel és mtsai 2003). A HHV6 közvetlenül elpusztíthatja a célsejteket, vagy immun/autoimmun reakciót válthat ki, melynek eredményeként megváltozik a gazdaszervezet citokin expressziós mintázata. Egy 2002-es tanulmányban, melyben a HHV6 az aorta és a szív érhalózatának endotél sejtjeit fertőzte meg, feltehetően a vizsgálat során észlelt megváltozott kemokin mintázat aktiválhatta az immunkompetens sejteket, mellyel gyulladásos folyamatokat idézett elő (Caruso és mtsai 2002). HHV6 szabályozhatja a sejtmembrán receptorokat, mellyel egyrészt szöveti gyulladást, másrészt immunszuppressziót képes előidézni és megakadályozza a vírus kiürülését (Krueger és Ablashi 2003). A HHV6 megváltoztatja a membrán fluiditását és a CD4 továbbá más membrán molekulák expresszióját váltja ki a fertőzött sejtekben (Clark 2000). Jelenlétével más vírusok infekciós képességét aktiválja, mint például EBV és PVB19, ily módon képes felerősíteni az említett vírusok patogenitását (Krueger és Ablashi 2003). Ritkán fordul elő halálos kimenetelű szisztémás betegség HHV6 infekció következtében (Prezioso és mtsai 1992).

Nemrégiben azonosították a HHV6 celluláris receptorát (CD46), azonban a CD46 expressziójának csökkenését figyelték meg HHV6 vírusinfekciót követően (Santoro és mtsai 1999).

1.3. Kardiomiopátiák

1.3.1. Kardiomiopátiák osztályozása

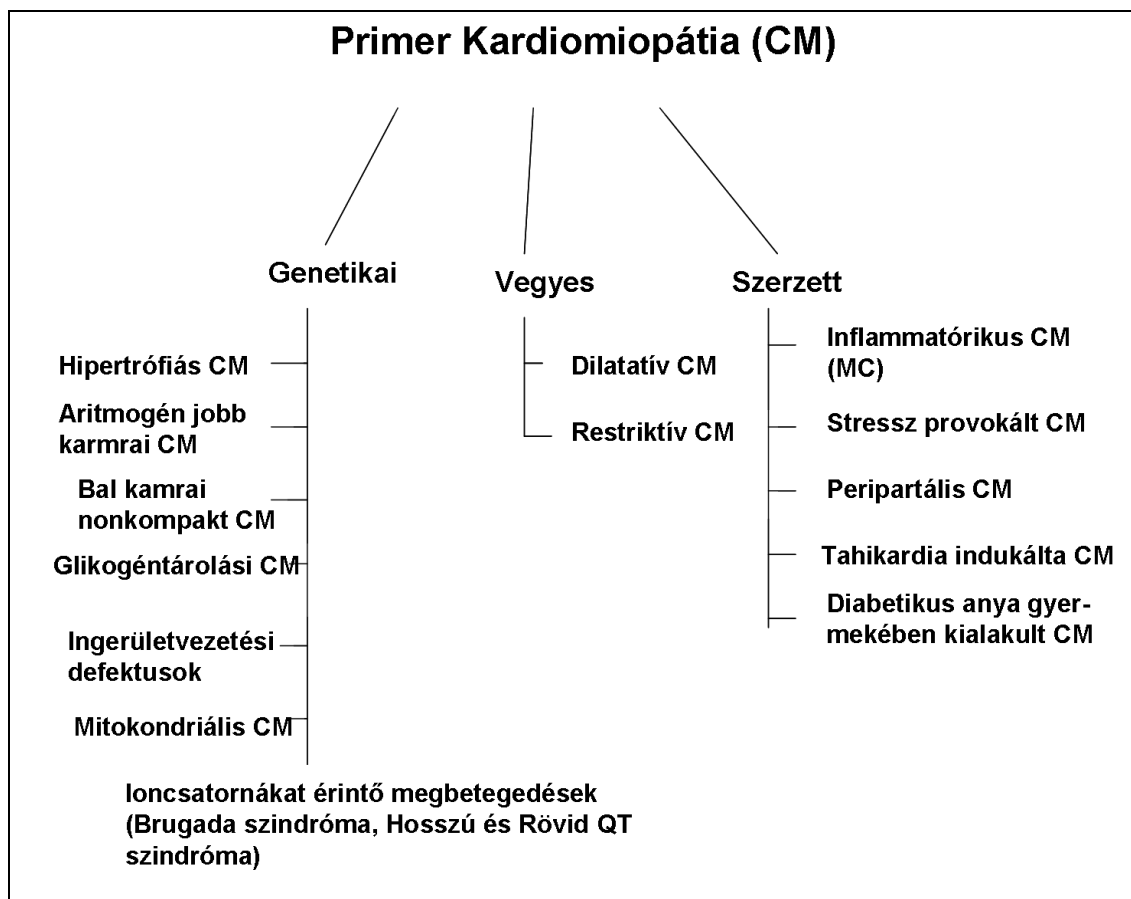
Az 1850-es években a krónikus MC volt az egyedüli ismert szívizombetegség (Richardson és mtsai 1996). 1957-ben került bevezetésre a kardiomiopátia (CM) megnevezés. A következő 25 évben, köszönhetően az egyre növekvő ismereteknek, számos definíció került bevezetésre CM esetében (Maron és mtsai 2006). Az 1980-as WHO osztályozás (Brandenburg és mtsai 1980) már „ismeretlen eredetű szívizombetegség”-ként definiálta, mely arra enged következtetni, hogy bizony igen nagyfokú hiányosságok voltak akkor még a betegség alapmechanizmusának ismeretében. Az 1995-ös WHO osztályozás (Richardson és mtsai 1996) alkalmával már „funkcióképtelenséggel járó szívizombetegség”-ként definiálták. A legújabb meghatározás szerint „a CM-ek a szívizombetegségek heterogén csoportját alkotják, melyek mechanikai és/vagy elektromos funkcióképtelenséggel párosulnak és általában kamrai hipertrófiát vagy dilatációt mutatnak, melynek hátterében különböző okok állnak” (Maron és mtsai 2006).

A CM-ek osztályozása napjainkra sem teljesen tisztázott, ez okból folyamatosan újabb és újabb kiegészítésekkel módosítanak rajta. Jelenleg a World Health Organization (WHO) és az International Society and Federation of Cardiology (ISFC) által felállított osztályozási rendszert alkalmazzák a gyakorlatban, mely elkülönít dilatatív, hipertrófiás, aritmogén jobb karmrai (ARVCM) és restriktrív CM-et. Az alaptípusokon túl a következő módosítások kerültek bevezetésre köszönhetően a kardiológia területén alkalmazott molekuláris genetika gyors fejlődésének:

- 1) specifikus szívizombetegségek csoportját specifikus CM-nek nevezték (amiloidózis, hemokromatózis);
- 2) nem osztályozott CM csoportot vezették be, melyekbe a nonkompakt, alig dilatált és a mitokondriális CM-ek kerültek besorolásra;
- 3) MC-t, mint inflammatorikus CM-et, továbbá az iszkémiás, valvuláris és hipertenzív típusokat besorolták a specifikus CM-ek közé (Richardson és mtsai 1996).

A CM-ek osztályozásának 2006-os újragondolása során két alaptípust határoztak meg. A primer CM-ek (genetikai, nem-genetikai és szerzett formák) **(1.3.1a. ábra)**

megjelenésére jellemző, hogy kizárólag vagy túlnyomórészt a szívizomra korlátozódnak. A szekunder CM-ek patológiai eltérést mutatnak a szívizomban, mely része valamilyen szisztémás (több szervet érintő) betegségnek, ezeket az 1995-ös osztályozásban specifikus CM-nek nevezték.



1.3.1a. ábra: Primer CM-ek osztályozása. (Forrás: Maron és mtsai 2006)

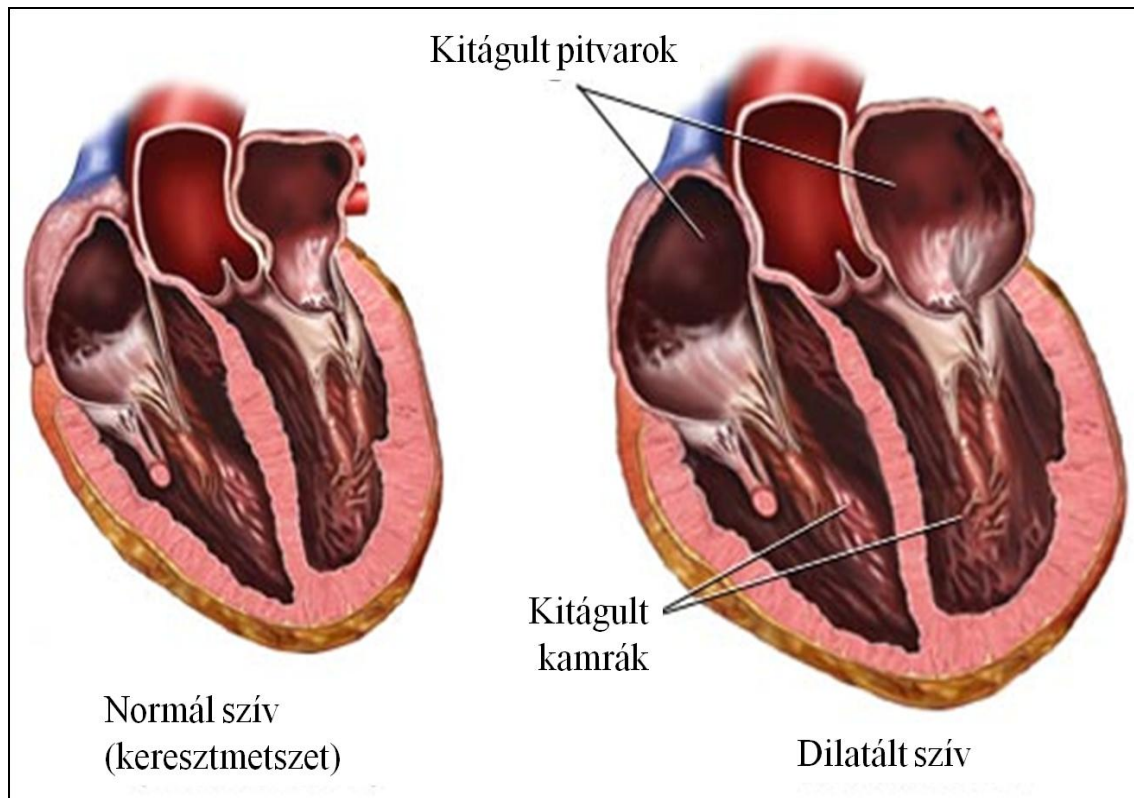
Az 1980-as osztályozásban bevezetett hipertróf, dilatatív és restriktív CM esetében keveredik az anatómiai (hipertrófiás, dilatatív) a funkcionális jellegzetességekkel (restriktív), melynek következményeként ugyanaz a betegség két kategóriában is előfordulhat (Maron és mtsai 2006). A dilatáltság kialakulása folytonos és egyes személyek esetében eltérhet a kamraméret annak kvantitatív becslése során, így gyakran nehézségekbe ütközik a nem-dilatált és dilatált forma elkülönítése (Maron és mtsai 2006). Az etiológia alapján történő csoportosítás is korlátokba ütközik, hiszen a hasonló fenotípus eltérő etiológiát takar. Erre jó példa a dilatatív CM, ahol számos ok játszhat szerepet a kórkép kialakulásában, azonban mindegyik esetben kamrai dilatáció

és szisztolés funkcióképtelenség alakul ki. A klinikusok számára azonban elegendőnek tekinthető a funkcionális osztályozás a kezelés kiválasztásának szempontjából (Maron és mtsai 2006).

1.3.1.1. Dilatatív CM

A dilatatív CM-es kórképre jellemző a szívmegegyesülés és a leromlott szisztolés kamrafunkció, mely akár mindkét szívkamrát érintheti egyszerre (de Leeuw és mtsai 1998).

A dilatatív CM patológiai képére jellemző, hogy a szív minden ürege dilatált és megegyesült, azonban a kamrák dilatáltsága fokozottabb a pitvarokéval szemben (1.3.1.1a. ábra). A kamra falvastagsága néhány esetben megegyesült, a hipertrófia mértéke azonban gyakran kisebb a vártnál.



1.3.1.1a. ábra: Normál és dilatált szívizom képe.
(Forrás: CentraCare Health System <http://www.centracare.com/>)

A dilatatív CM diagnosztizálása az esetek nagyobb részében már a kórfolyamat előrehaladottabb állapotában történik, melyet már a NYHA osztályozás III. vagy IV. csoportjába tartozó tünetegyüttesek jellemeznek (Sugrue és társai 1992). A betegség kezdeti fázisában a betegek jelentős részében egyáltalán nem jelentkezik vagy minimális a dilatatív CM-re utaló tünet (de Leeuw és mtsai 1998).

A szívelégtelenség fokozatait a New York Heart Association (NYHA) a következő négy stádiumra osztja a szívbeteg mindennapos tevékenységének korlátozottsága alapján:

- I. A fizikai aktivitás nem korlátozott. A szokásos fizikai terhelés nem okoz indokolatlan fáradtságot, nehézlégzést vagy anginás fájdalmat.
- II. A fizikai aktivitás kis mértékben korlátozott. A szokásos fizikai tevékenység már tüneteket vált ki.
- III. A fizikai aktivitás nagymértékben korlátozott. Nyugalomban a beteg panaszmentes, de már a szokásosnál kevesebb mozgás is tüneteket vált ki.
- IV. Mindennemű fizikai aktivitás rontja a beteg közérzetét. A tünetek nyugalmi állapotban is fennállnak.

A jelenlegi gyakorlatban a dilatatív CM etiológiai szempontból való elkülönítése alapján megkülönböztetünk: 1) familiáris és genetikai faktorokat; 2) vírusos MC-t és immunológiai kórfolyamatokat; 3) citotoxikus hatásokat.

Dilatatív CM familiáris eredete a vártnál lényegesen gyakoribb. Eddigi vizsgálati eredmények alapján elmondható, hogy az esetek 25-30 %-ában játszik örökletes tényező szerepet a betegség megnyilvánulásában. Egy prospektív tanulmányban tünetmentes családtagok vizsgálatában kimutatott balkamra megnagyobbodással rendelkező személyek nyomonkövetéses vizsgálatában az érintettek 30 %-ában fejlődött ki dilatatív CM három éves periódust követően (Baig és mtsai 1998). A legtöbb familiáris eredetű dilatatív CM autoszómás domináns öröklődést mutat. Több kromoszómális lokuszt azonosítottak a betegséggel kapcsolatban. Familiáris formájában citoskeletális, sejtmagmembrán és kontraktilis fehérjéket kódoló génekben mutattak ki mutációkat. Ennek ellenére a familiáris dilatatív CM genetikai értelemben igen heterogén csoportnak tekinthető, melyben autoszómás recesszív és X-hez kapcsolt öröklődés egyaránt előfordul. Az utóbbi esetre nagyon jó példa a disztrofin gén (Towbin 1998) promóter régiójában és az első exonban talált deléció, mely gyakran

jár együtt dilatatív CM-es kórképpel. Egy korábbi közleményben demonstrálták a Cocksackievírus B3 által kódolt proteáz 2A által közvetített disztrofín degradációt a vírussal fertőzött egerek szívizomzatában, mely a disztrofín asszociált glikoprotein komplex sérüléséhez vezetett (Badorff és mtsai 1999). Ez utóbbi megfigyelés is bizonyítja egyrészt a vírusok szerepét, másrészt a szerzett és a familiáris forma patogenezeise közötti hasonlóságot.

Dilatatív CM leggyakrabban a középkorúakat érintő megbetegedés és elsősorban férfiaknál fordul elő gyakrabban. Ez utóbbi tapasztalat azonban látszólag nincs szoros összefüggésben a magas vérnyomással, dohányzási-, vagy alkoholfogyasztási szokásokkal. Néhány beteg tünetmentes annak ellenére, hogy hónapok vagy akár évek óta áll fenn balkamrai dilatáció, mely klinikailag csak később kerül felismerésre, amikor a tünetek rosszabbodnak, vagy mikor mellkas röntgenfelvételen láthatóvá válik a megnagyobbodott szív. A betegek relatíve kis számában alakul ki azonnal szívelégtelenség egy szisztémás vírusfertőzés következtében. A leggyakoribb tünet a gyengeség és fáradtság, továbbá a csökkent szívteljesítmény. A jobb szívfelet érintő szívinfarktus egy késői, vészjósló jele a betegség meglétének. Mellkasi fájdalom a betegek kisebb hányadában jelentkezik és általában az iszkémiás szívbetegség velejárója.

A specifikus CM-ek közé sorolt iszkémiás CM esetén a szív vérellátása szenved koronáriás megbetegedés vagy szívinfarktus miatt másodlagos károsodást, és vezet a szív funkcióképtelen állapotához. A szívelégtelenség hátterében álló leggyakoribb ok az iszkémiás szívbetegség, míg a dilatatív CM áll a második helyen (de Leeuw és mtsai 1998). Klinikai szempontból az iszkémiás szívbetegség a végstádiumban dilatatív CM képében nyilvánul meg.

1.4. Coxsackie-Adenovírus Receptor

A Coxsackie-Adenovírus Receptor (CAR), mint sejtfelszíni fehérje az EV-k és AdV-k jelentős hányada számára teszi lehetővé a gazdasejtbe jutást vírusinfekció során (Dorner és mtsai 2005). A CAR egy 46 kDa protein, mely az immunglobulinszerű transzmembrán fehérjék újonnan felfedezett alosztályába, a CTX (*Cortical thymocyte marker in Xenopus*) típusú fehérjék közé tartozik (Fok és mtsai 2007) és két extracelluláris immunglobulinszerű domént hordoz (Dorner és mtsai 2005, Sasse és mtsai 2003). A CAR gén a 21-es kromoszómán található és 7 exonból áll.

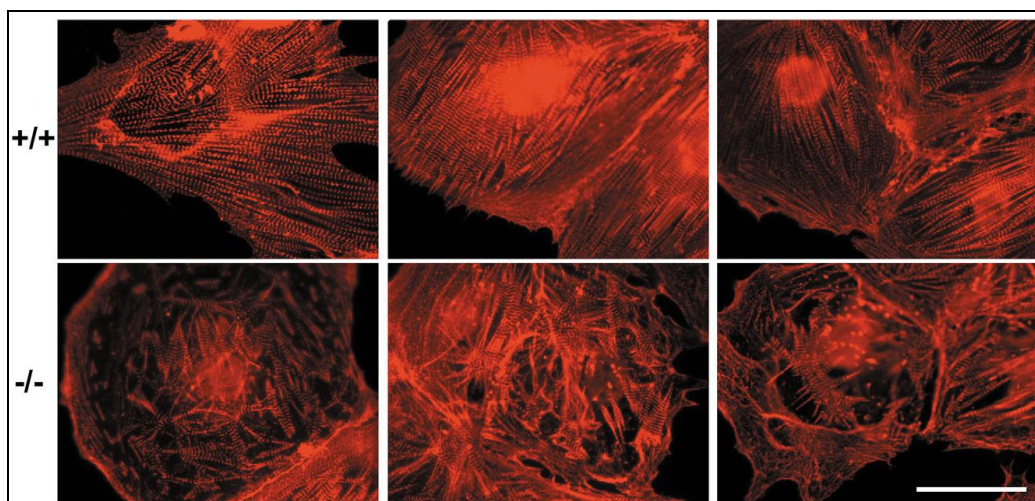
A CAR fehérje az epitél sejtek szoros illeszkedési (tight junction) pontjain fejeződik ki (Cohen és mtsai 2001), feltételezések szerint a sejtadhézióban vagy az intercelluláris felismerésben játszik szerepet (Coyne és mtsai 2005). Fiziológiai szerepe azonban nagyrészt ismeretlen (Dorner és mtsai 2005, Ito és mtsai 2000).

A CAR fehérje szöveti megjelenése az embrionális fejlődés folyamán jól szabályozott (Philipson és Pettersson 2004). Az elmúlt években derült fény arra, hogy egerekben a CAR elsősorban embrionális korban expresszálódik az agyban és a szívben igen nagy mennyiségben (Dorner és mtsai 2005), ami azt sugallja, hogy jelentős szereppel bír az említett szervek embrionális fejlődésében feltehetően a sejtek közötti kommunikáció fenntartása révén. A fehérje magas expresszióját figyelték meg egérembriók központi és perifériás idegrendszerében, továbbá az epitéliumban és a szívben (Tomko és mtsai 1997, Hotta és mtsai 1998). Ezzel szemben felnőtt egerek idegrendszerében alacsony mértékben expresszálódott, vagy egyszerűen hiányzott a CAR fehérje, hasonlóan a szívizomhoz, ahol szintén embrionális fejlődés során mutatták ki nagy mennyiségben (Hotta és mtsai 1998, Ito és mtsai 2000).

Egy közelmúltban végzett vizsgálat során figyelték meg a CAR tubulinnal és mikrotubulusokkal való interakcióját (Fok és mtsai 2007). A mikrotubulusok fontos szerepet töltenek be a sejt migrációban. Ennek alapján elképzelhető, hogy a CAR adhéziós molekula szerepét betöltve kapcsolatba lép a citoszkkeletonnal, szabályozva annak funkcióját.

Azokban az egérembriókban, ahol a CAR génben mesterségesen idéztek elő deléciót inaktívvá téve a fehérje funkcióját, az egérembriók a 11. nap környékén elpusztultak. A preparált szívben megnagyobbodott perikardiumot találtak, a kamrák

ürege kisebb lett, továbbá egyértelműen megnagyobbodott kamrafalat és csak egy atrioventrikuláris csatornát figyeltek meg, míg egészséges egerekben, ugyanebben a fejlődési szakaszban már két atrioventrikuláris csatorna volt jelen, mely egyértelműen a szív fejlődésének elmaradását támasztotta alá (Dorner és mtsai 2005). Emellett megfigyelték, hogy normál sejtekben általában 12-15 szarkomer kapcsolódik egymáshoz hosszanti irányban, míg a mutáns sejtekben csak 4-6, továbbá a miofibrillumok gyakran izoláltan helyezkedtek el a CAR hiányos szívizomsejtekben (**1.4a. ábra**), mely feltehetően a sejtek kontrakciós kapacitását befolyásolta (Dorner és mtsai 2005). A CAR célzott delécioja az embrionális fejlődés során a miofibrillumok rendezetlenné válása mellett megnövekedett szívizomsejt proliferációt és apoptózist idézett elő (Asher és mtsai 2005, Chen és mtsai 2006).

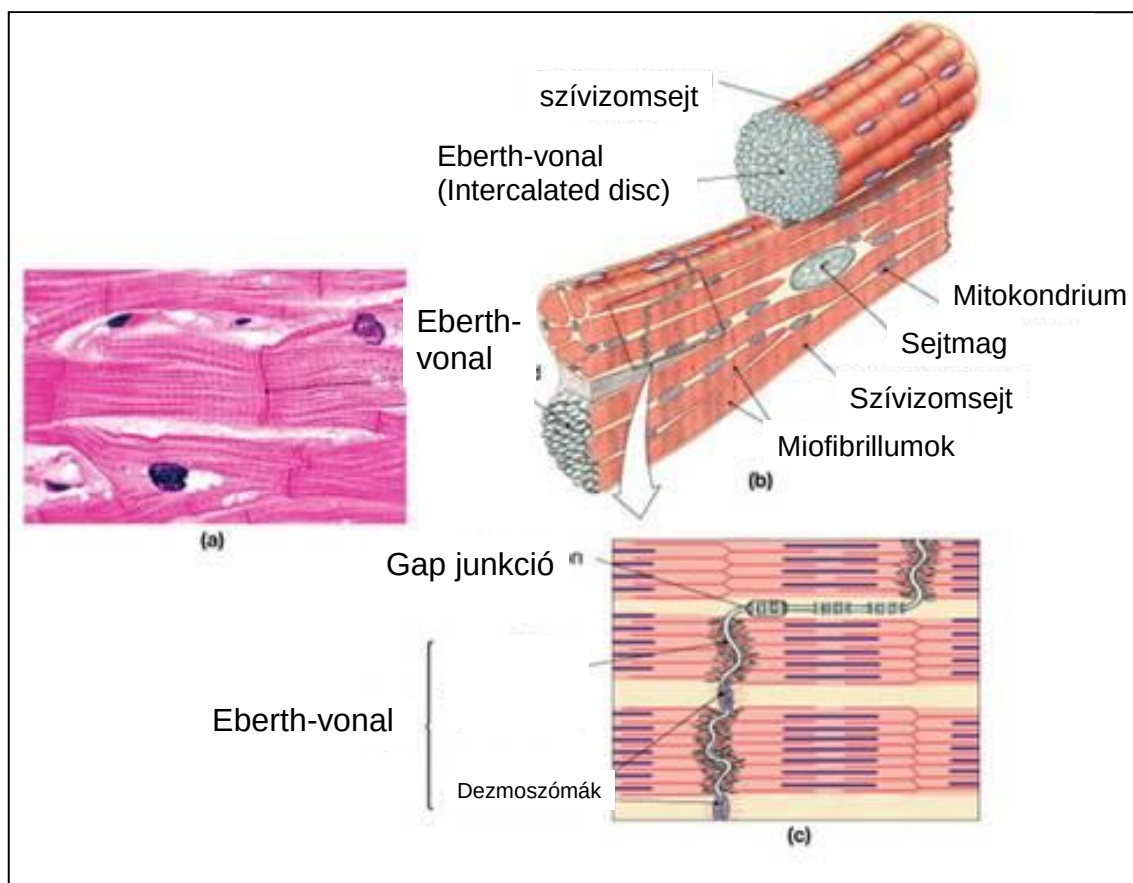


1.4a. ábra: Vad típus (+/+) és CAR^{-/-} egér embriókból származó szívizomsejt tenyészetben a szarkomerikus alfa-aktin immunfluoreszcens festésével demonstrált miofibrillum elhelyezkedés. (Forrás: Dorner és mtsai 2005)

Kimutatták patkányokban, hogy sertés miozin indukált autoimmun MC során újra expresszáldott a CAR fehérje a szívizomban (Ito és mtsai 2000).

Az egyes szívizomsejteket a rostokra merőleges lefutású, sötétre festődő hálózatos membránrendszer, az ún Eberth-vonal (*Intercalated disc*=ICD) választja el egymástól. Anatómiai értelemben ez egy junkciónak feleltethető meg, míg funkcionálisan már nem mondható annak, mivel a szívizom közismerten szincícium.

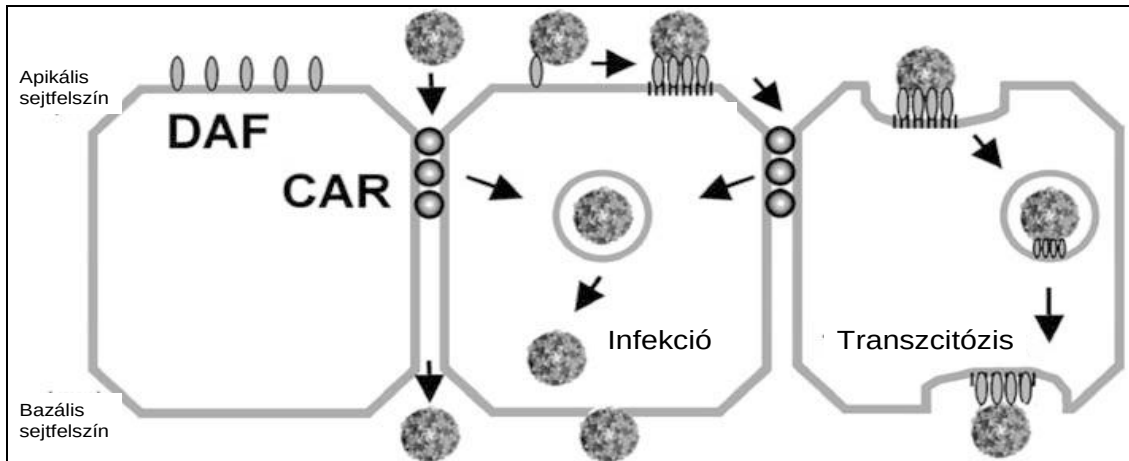
Megfigyelték korábban, hogy a CAR fehérje az alfa(v)béta3 és az alfa(v)béta5 típusú integrinokkal együtt helyezkedik el a szarkolemmában és az ICD-kben dilatatív CM-es betegek esetében (Noutsias és mtsai 2001) (**1.4b. ábra**).



1.4b. ábra: Szívizom felépítése.

(Forrás: 2004 Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings, www.as.miami.edu/chemistry/2086/new-chap20/new-chapter%2020part1-class.htm)

A CAR extracelluláris doménje alkalmas a Cocksackie B vírus megkötésére és a gazdasejtbe való internalizációjára (Wang és Bergelson 1999). Rekombináns human CAR proteint expresszáló szívizomsejtekben megnőtt a sejtek vírus bejutási aránya (Noutsias és mtsai 2001). A *Decay Accelerating Factor* (DAF, CD55), mely a komplement rendszer szabályozásában a C3 konvertáz bomlását aktiválja és gyorsítja mind a klasszikus, mind az alternatív útvonalon, elősegíti a vírus CAR-hoz való kötődését (Tam 2006), és képes megkötni bizonyos Cocksackie vírus szerotípusokat (**1.4c. ábra**). Ezzel szemben rágszálókban a DAF nem rendelkezik vírus megkötő képességgel (Spiller és mtsai 2000).



1.4c. ábra. A víruspartikulum CAR és DAF receptorokon keresztül történő gazdasejtbe jutásának sematikus képe. (Forrás: Selinka és mtsai 2004)

Érdekesség azonban, hogy a Coxsackie B vírus RD sejtekben szaporodott, azonban a sejtek nem CAR-t expresszáltak detektálható mértékben, hanem DAF-ot (Bergelson és mtsai 1995). A heparán-szulfátokat másodlagos receptorként tartják számon, mivel Coxsackie B3 PD variánssal képesek voltak CAR és DAF negatív sejteket megfertőzni (Zautner és mtsai 2003).

2. Célkitűzések

1. Milyen gyakorisággal fordulnak elő a vizsgált vírus szekvenciák a szívtranszplantált betegek szívizomzatában?
2. Kimutathatóak-e ezen vírus szekvenciák iszkémiás CM-es betegekben is?
3. Tekinthesse-e kontrollnak vírus kimutatás szempontjából az iszkémiás eredetű CM-es beteg?
4. Vírus-pozitív minták tekintetében a különböző mintavételi helyek mutatnak-e valamilyen szabályszerűséget?
5. Vírus-pozitív eredményeink esetében az adott régió szövettani vizsgálata igazolja-e gyulladás jelenlétét?
6. Kimutatható-e magas CAR mRNS expresszió vizsgálati beteganyagunkban a kontroll, egészséges szívmintákhoz képest és igazolható-e immunfluoreszcens vizsgálattal a mRNS szintű eredményünk?

3. Módszerek és anyagok

3.1. Víruskimutatás és szövettani vizsgálat

3.1.1. Betegpopuláció

2005. november és 2008. március között folyamatos mintagyűjtés során 35 szívátültetésre került CM-es betegből (8 nő, 27 férfi, átlagéletkor 46.54 ± 12.16 év) explantált szív jobb- és bal kamra elülső (JKEF, BKEF), illetve hátsó falából (JKHF, BKHF), bal kamra csúcsi régiójából (BKAR) származó szívizommintákat, továbbá vérmintákat analizáltunk vizsgálataink során. A 35 beteg közül 16 dilatatív, 17 iszkémiás és 2 inflammatórikus CM-ben szenvedett. A szívizommintákat -80°C -on tároltuk. Intézetünkben boncolásra került 20, balesetben elhunyt személytől származó szívizomminták alkották a vizsgálatok során a kontrollcsoportot (7 nő, 13 férfi, átlagéletkor $45,9 \pm 10,28$ év).

A kutatási tervet a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte a 68/2005. szám alatt.

3.1.1a. táblázat: A betegek transzplantációt megelőzően mért ejekciós frakciójának átlaga:

	Dilatatív CM	Iszkémiás CM	Inflammatórikus CM
Átlag ejekciós frakció (EF)	$26,25 \pm 0,0791$	$31,36 \pm 0,1171$	$15 \pm 0,0707$

3.1.2. DNS izolálás

A CM-es betegektől és a kontrolloktól származó szívizomminták DNS extrakciója DNeasy Tissue Kittel (Qiagen, USA), történt a következők szerint: 1,5 ml-es steril csőben biztosítottuk a kb. 20 mg szívizomdarabokat. 180 μl ATL puffert és 20 μl Proteináz K-t adtunk hozzá, majd 55°C -on inkubáltuk egy éjszakán át a szövetminta teljes mértékű emésztődéséig. A további lépéseket a mellékelt protokoll szerint végeztük.

A CM-es betegektől származó vérminták DNS extrakcióját DNeasy Blood and Tissue Kittel (Qiagen, USA) végeztük, melynek során 1,5 ml-es steril csőbe 20 µl Proteináz K-t tettünk, majd hozzápipettáztuk a 100 µl vérmintát, majd 220 µl végtérfogat eléréséhez hozzáadtunk még foszfát-pufferolt sóoldatot (PBS). Ezt követően 200 µl AL puffert adtunk hozzá, majd vortexeltük és 56°C-on inkubáltuk 10 percen át. A további lépéseket a mellékelt protokoll szerint végeztük.

3.1.3. RNS izolálás

A teljes RNS kinyeréshez a CM-es betegektől és a kontrolloktól származó szívizommintákat folyékony nitrogénben porítottuk, majd 1 ml Trizol reagens (Invitrogen, USA) hozzáadásával további homogenizálásig fel-le pipettáztuk. Ezt követően 5-10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután 200 µl kloroform rámerését követően 3 percig inkubáltuk, és 15 percen keresztül 13000 g-vel centrifugáltuk. A felső vizes fázist lepipettáztuk, 70 µl 3 M Na-acetátot és 700 µl izopropanolt mértünk hozzá, 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 10 percig 13000 g-vel centrifugáltuk. A vizes fázist lepipettáztuk, a csapadékot abszolút alkoholban mostuk és 5 percig 7500 g-vel centrifugáltuk. A vizes fázist újra lepipettázva, a csapadékot 75 %-os alkoholos mosást követően ismét 5 percig 7500 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót lepipettáztuk és szobahőmérsékleten hagytuk kiszáradásig, majd a kiszáritott csapadékot DEPC vízben oldottuk fel. Az izolált RNS koncentrációját 260 nm-en mértük spektrofotométer (Nanodrop, USA) alkalmazásával. Az izolált RNS minőségét 1%-os agaróz gélen ellenőriztük etídium-bromidos festéssel.

3.1.4. Vírus szekvencia kimutatás nested PCR alkalmazásával

3.1.4.1. Adenovírus 2, Adenovírus 3 és HHV6 vírus szekvenciák kimutatása

A fagyasztott beteg szívizommintákból és vérmintákból, továbbá a kontroll fagyasztott szívizommintákból történt DNS kinyerést követően PCR technika alkalmazásával végeztük az Adenovírus 2 típus hexon, Adenovírus 3 típus hexon, Humán Herpesz Vírus 6 típus alkalin-exonukleáz (Maxim Biotech, USA) régiók

sokszorosítását (**3.1.4.1a. táblázat**). A reakció érzékenységének és specifitásának érdekében újabb polimeráz láncreakciós lépést iktattunk be az első körben sokszorosított szekvencián belülre tervezett primerpárral (Invitrogen, USA).

A sokszorosítás 25 µl-es térfogatban történt. Minden egyes minta esetében 50 ng templát DNS-t adtunk a rendszerhez. A sokszorosítás körülményei a következők voltak: 1) kezdő denaturáció 96 °C-on 1 perc; 2) denaturáció 94 °C-on 1 perc, annelláció 58 °C-on 1 perc, és szintézis 72 °C-on 1 perc 35 cikluson keresztül; 3) végső extenzió 72 °C-on 10 perc. A PCR kivitelezése Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700-es készülékben történt. A második sokszorosítás is a fent leírt kondíciók szerint történt.

A PCR termékeket 8 %-os poliakrilamid gélen futtatuk, majd a vírus-pozitív mintákat 1,75 %-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, etídium-bromiddal vizualizáltuk. A kapott fragmens méreteket molekulasúly markerrel hasonlítottuk össze (100 bp létra, BioRad, Dánia).

3.1.4.1a. táblázat: A vizsgált vírus szekvenciák (AdV2, AdV3, HHV6) sokszorosításához alkalmazott primerek.

Verziószám (tartomány)	Termék mérete	Vírus típus	Forward/reverz primerek
GI: 9626158 (20230-20605)	375 bp	AdV2 külső	CgTAATgAAATAggAgTgggTA/ ggAggAggTTTTTAATggCAAA
(20330-20536)	206 bp	AdV2 belső	CAGACAAgCTAAAATACAACCC/ CCAACAACATggAgCgATAA
GI: 197944726 (20666-21128)	462 bp	AdV3 külső	AATgCAACATgACCAAAGACTggTTC/ TCATCCATgggATCCACCTCAA
(20759-20972)	225 bp	AdV3 belső	CAAggATCgCATgTACTCCT/ gTgACACTCTTAACggCAGT
GI: 325494 (20083-20605)	522 bp	HHV6 külső	CTAAGTgCCgTggCAGAAgAAgAg/ CgAggTgTCTAATAACACgCTCATgT
20182-20505	323 bp	HHV6 belső	CgCTTgTgTCATgTTTACTgC/ CggCgACTAAgTTgTATgAC

3.1.4.2. Enterovírus szekvencia kimutatása

A fagyasztott beteg és kontroll szívizommintákból történt RNS kinyerést követően 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük az RNS minőségét.

A cDNS átírás során 30 µg RNS-t, 1 µl random hexamer primert (150 ng/µl) és 1 µl dNTP mix-et (10mM) (Invitrogen, USA) adtunk, majd DEPC vízzel 12 µl-re feltöltöttük. 65°C-on 5 percen át inkubáltuk, majd 4 µl 5x First strand puffert, DTT-t (0,1 M) és RN-ase Out-ot (40 U/µl) (Invitrogen, USA) adtunk a master mixhez, melyből 7 µl-t mértünk minden egyes mintához. Ezt követően 37°C-on 2 percig inkubáltuk. A reakció utolsó lépéseként 1 µl M-MLV RT-t (200 U/µl) (Invitrogen, USA) adtunk minden egyes mintához és 25°C-on 10 percig, 37°C-on 50 percig, végül 70°C-on 15 percig inkubáltuk.

A cDNS átírást követően a mintákat -80°C-on tároltuk a további felhasználásig. A továbbiakban polimeráz láncreakcióval végeztük el az EV 5' nem-kódoló (Maxim Biotech, USA) régió sokszorosítását (**3.1.4.2a. táblázat**). A reakció érzékenysége és specifitásának érdekében újabb polimeráz láncreakciós lépést iktattunk be az első körben sokszorosított szekvencián belülre tervezett primerpárral (Invitrogen, USA).

A sokszorosítás ebben az esetben is 25 µl-es végtérfogatban történt. A sokszorosítás körülményei és a PCR termékek detektálási módjai megegyeztek a DNS vírusok esetében alkalmazott beállításokkal és módszerekkel.

3.1.4.2a. táblázat: A vizsgált vírus szekvencia (EV) sokszorosításához alkalmazott primerek.

Verziószám	Termék mérete	Vírus típus	Forward/reverz primerek
GI: 9626677 (541-1196)	655 bp	EV külső	CgACTACTTTgggTgTCCgTgTTTC/ ggTAACTTCCACCACCAACC
583-753	170 bp	EV belső	gCTgCTTATggTgACAATTgA/ TTgAgCCCCCATTTTgTTg

3.1.5. Vírus-pozitív minták direkt szekvenálása

A vírus-pozitív minták esetében direkt szekvenálással ellenőriztük, hogy ténylegesen a kívánt vírus szekvenciát sikerült-e sokszoroznunk. Ennek során a PCR terméket High Pure PCR Purification kit segítségével megtisztítottuk a nem kötődött primerektől, dNTP-ktől (Roche, Svájc) a gyártó utasításai szerint.

A tisztító lépést követően 6 µl amplifikációs terméket, 5 µl forward/reverz primert, 4 µl BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing mixet, 2 µl 5X sequencing puffert és 3 µl ddH₂O-t használtunk fel a 20 µl végtérfogatú szekvenáló PCR-hez (Applied Biosystems, USA). A szekvenáló PCR kondíciói a következők szerint kerültek beállításra: 96 °C 1 perc, majd 30 cikluson keresztül 94 °C 40 másodperc, 58 °C 40 másodperc, és 72 °C-on 40 másodperc, végül az extenzió 72 °C-on 10 perc.

A sokszorozási reakciót követően ismételt tisztítást végeztünk a nem kötődött dNTP-k és primerek kivonására, mely a DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, USA) alkalmazásával történt. Ezt követően a megtisztított templáthoz 1:1 térfogatarányban Hi-Di Formamidot (Applied Biosystems, USA) adtunk hozzá. A minták analízise ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-en (Applied Biosystems, USA) történt. A kapott adatok kiértékeléséhez a Sequencing Analysis 3.7 szoftvert alkalmaztuk, és a szekvenciákat a National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank adatbázisban megtalálható vírus szekvenciákhoz hasonlítottuk (**3.1.4.1a.** és **3.1.4.2a.** táblázatokban leírt verziószámok alatt).

3.1.5. Hisztológiai vizsgálat

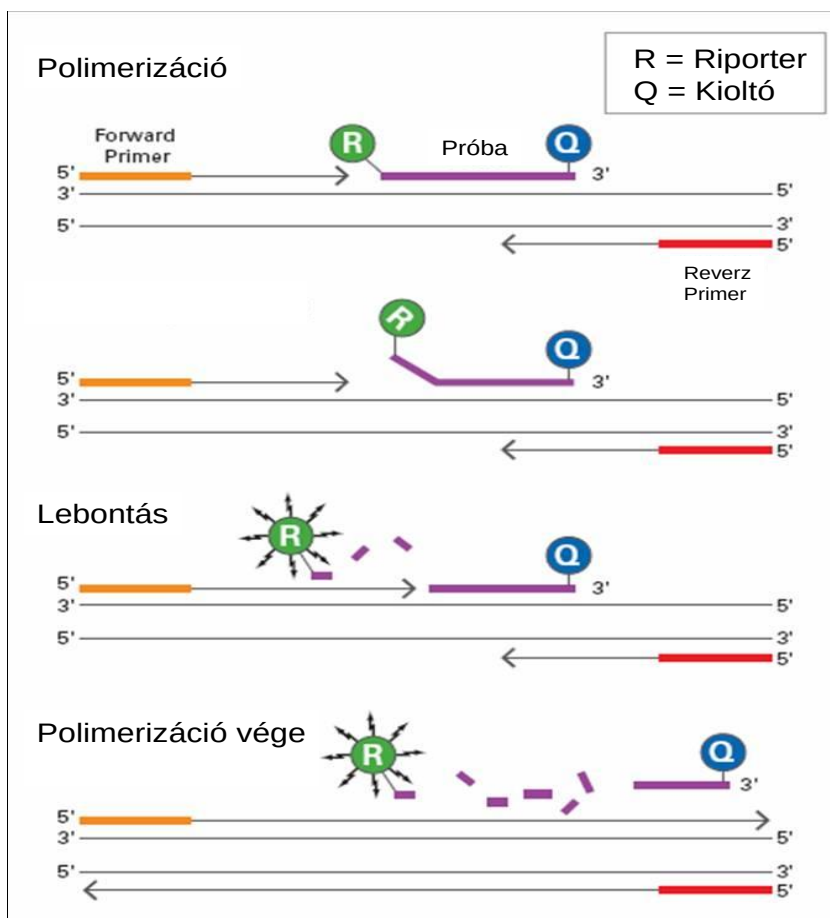
A szívtranszplantáción átesett betegek explantált szívét az intézetünkbe kerülve formaldehidben történt fixálást követően szövettani vizsgálatnak vetettük alá.

A 10 %-os pufferezett formaldehid fixálást követően a szövettani mintákat az intézetünkben alkalmazott módszer alapján kiágyasztuk és lemetszettük a 3 µm vastagságú metszeteket, melyeket Hematoxin-eozin (HE), van Gieson és Foszforsav-hematoxin (PTAH) módszerekkel festettünk és Nikon Eclipse E400 fénymikroszkóppal vizsgáltunk.

3.2. CAR expressziós vizsgálata és a CAR exonok szekvenálása

3.2.1. CAR mRNS expressziós vizsgálata

A TaqMan detektálás során az alkalmazott primereken túl egy próba is megtalálható, melynek 5' végén egy fluoreszcens festéket tartalmazó riporter molekulát, 3' végéhez pedig egy kioltó (ún. quencher) molekulát kapcsolnak. A próba a PCR reakció anellációs lépésében a két primer által közrezárt régióhoz kötődik, melynek során a kioltó molekula a riporter molekulához való közelsége miatt kioltja annak fluoreszcenciáját. A polimeráz enzim 5' exonukleáz aktivitásának köszönhetően az elongáció szakaszában lebontja az elékerülő próbát, melynek köszönhetően a riporter molekula eltávolodik a kioltó molekulától és így módon felszabadul a gátlás alól a riporter molekula fluoreszcenciája, mely egyenesen arányos a keletkezett termék mennyiségével (3.2.1a. ábra).



3.2.1a. ábra: A PCR termék detektálása Taqman próbával.

A vizsgálat során 35 beteg szívizommintáját és 10 kontroll személy szívizommintáját analizáltuk. A cDNS átírás során 30 µg RNS bemérését követően 1 µl random hexamer primert (150 ng/µl) és 1 µl dNTP mix-et (10mM) (Invitrogen, USA) adtunk, majd DEPC vízzel 12 µl-re feltöltöttük. 65°C-on 5 percen át inkubáltuk, majd 4 µl 5x First strand puffert, DTT-t (0,1 M) és RN-ase Out-ot (40 U/µl) (Invitrogen, USA) adtunk a master mixhez, melyből 7 µl-t mértünk minden egyes mintához. Ezt követően 37°C-on 2 percig inkubáltuk. A reakció utolsó lépéseként 1 µl M-MLV RT-t (200 U/µl) (Invitrogen, USA) adtunk minden egyes mintához és 25°C-on 10 percig, 37°C-on 50 percig, végül 70°C-on 15 percig inkubáltuk.

A cDNS átírást követően a mintákat -80°C-on tároltuk a későbbi felhasználásig. Ezidő alatt a master mixet összeállítottuk az ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems készüléken elvégzett (Applied Biosystems, USA) kvantitatív PCR reakcióhoz, melyhez mintánként 10 µl 2x TaqMan master mixet, 1 µl primert (Applied Biosystems, USA) és 7 µl DEPC vizet adtunk. Ezt mind az endogén kontrollként alkalmazott béta-aktin (kat.szám.: FAM/MGB 4333762, Applied Biosystems, USA), mind a CAR (kat.szám.: HS00154661_m1, Applied Biosystems, USA) esetében összemértük. Az endogén kontroll és a CAR primereket tartalmazó master mix-et egy 96-lyukú lemezre vittük fel (Applied Biosystems, USA), melynek minden egyes lyukába 2 µl cDNS-t mértünk ki. A készüléket az alábbiak szerint állítottuk be: kezdeti denaturáció 95°C 10 perc, denaturáció 95°C 1 perc és annelláció-extenzió 60°C 1 perc 40 cikluson keresztül. Minden egyes mintából három párhuzamos mérést készítettünk.

A mérés során kirajzolódott görbe lineáris részéhez illesztett egyenessel képzett metszéspontját vettük C_T értéknek, ami az a ciklusszám, ahol a mért fluoreszcencia átlépi az egyenessel kijelölt küszöbértéket. A CAR mRNS koncentrációt a béta-aktin koncentrációjához mértük relatív kvantifikációval az alábbiak szerint.

1. Egy mintában a három párhuzamos mérésből meghatároztuk az átlagos C_T értéket.
2. $\Delta C_T = C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ referencia}}$
3. $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ kalibrált}}$
4. Relatív expresszió (CAR/béta-aktin): $2^{-\Delta \Delta C_T}$

A statisztikai analízist Student t-próba alkalmazásával végeztük és a $p < 0,05$ érték esetében tekintettük eredményeinket szignifikánsnak.

3.2.2. CAR immunfluoreszcens vizsgálata

Az immunfluoreszcens vizsgálat során kriosztáttal lemetsztük a 10 μm vastagságú szívizommintákat, majd Superfrost (Menzel-Gläzer, Németország) tárgylemezre helyeztük a lemetszett darabokat és -20°C -on tárolt metanolban 10 percig, majd acetonban 10 másodpercig fixáltuk. Ezt követően PBS-ben rehidráltuk a metszeteket, majd az antitest aspecifikus fehérjekötődését 30 percen keresztül 37°C -on PBS-ben oldott 5%-os BSA-val (Sigma-Aldrich, Németország) kerültük el. Ez idő alatt elkészítettük a CAR (Santa Cruz Biotechnology, USA) nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges ellenanyag 1:50 hígítását PBS-ben oldott 1%-os BSA-val. Ezt követően egy éjszakán át 4°C -on inkubáltuk a metszetekre helyezett elsődleges ellenanyaggal. A következő nap PBS-ben való mosással eltávolítottuk az elsődleges ellenanyagot, majd a metszetekre ráhelyeztük a fluoreszcensen jelölt PBS-ben 1:200 arányban oldott AlexaFluor 488 jelölt anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyagot (Invitrogen, USA) és 30 percen át inkubáltuk. Az inkubálást követően lefedtük a mintákat a Dako Fluorescent Mounting Mediumával (DAKO, Dánia), melybe belekevertük magfestés céljából a 4,6-diaminido-2-fenilindolt (DAPI, Boehringer Mannheim, Németország), mely a magi DNS-hez kötődve kék színt ad. A fluoreszcens felvételeket a BioRad Radiance 2000 (Bio-Rad, USA) konfokális mikroszkóppal készítettük a mikroszkóphoz tartozó Laser Sharp programmal.

3.2.3. CAR gén exonjainak szekvenálása

A beteg CM-es és kontroll szívizommintákból izolált DNS-ből (50 ng) a **3.2.3a.** táblázatban feltüntetett szekvenciájú primerekkel sokszorozítottuk a CAR gén 7 exonját. Az exonok amplifikálásához a CLC Main Workbench 6.0.2 (CLC Bio, Dánia) programmal terveztük a primer szekvenciákat.

A 25 μl végtérfogatú PCR elegyhez 10,5 μl ddH₂O-t, 2,5 μl 10x Reaction puffert (Eurogentec, Belgium), 1 μl Mg₂Cl₂-t (50 mM) (Eurogentec, Belgium), 2 μl dNTP-t

(200 μM) (Amersham Biosciences, Svédország), 0,5-05 μl forward/reverz primert (1 μM) (Sigma-Aldrich, Németország), 2 μl BSA-t (10mg/ml) (Sigma-Aldrich, Németország) és 1 μl 1 U SilverStar DNS polimerázt (5 U/ μl) (Eurogentec, Belgium) mértünk, majd 5 μl (50 ng) templát DNS-t pipettáztunk az elegyhez. A PCR körülményei a következők szerint kerültek beállításra: kezdő denaturáció 95 °C-on 10 perc; 2) denaturáció 95 °C-on 40 másodperc, annelláció 58 °C-on 40 másodperc, és szintézis 72 °C-on 40 másodperc 30 cikluson keresztül; 3) végső extenzió 72 °C-on 10 perc. A sokszorosítás végén kapott PCR terméket 8 %-os poliakrilamid gélen ellenőriztük, majd High Pure PCR Purification kit (Roche, Svájc) segítségével megtisztítottuk a nem kötődött primerektől, dNTP-ktől a gyártó utasításai szerint.

A tisztító lépést követően 3 μl amplifikációs terméket, 2,5 μl forward/reverz primert (0,1 μM), 2 μl szekvenáló mixet, 2 μl 5X sequencing puffert és 3,5 μl ddH₂O-t használtunk fel a 10 μl végtérfogatú szekvenáló PCR-hez (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems, USA). A szekvenáló PCR kondíciói megegyeztek az első körben végzett reakció beállításával.

A sokszorosítási reakciót követően ismételt tisztítást végeztünk a nem kötődött dNTP-k és primerek kivonására, mely a DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, USA) alkalmazásával történt. Ezt követően a megtisztított templáthoz 1:1 térfogatarányban Hi-Di Formamidot (Applied Biosystems, USA) adtunk hozzá. A minták analízise ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-en (Applied Biosystems, USA) történt. A kapott adatok kiértékeléséhez a Sequencing Analysis 3.7 szoftvert alkalmaztuk, és a szekvenciákat a National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genebank adatbázisban megtalálható CAR (GI: 6690789) exon szekvenciákkal a Bioedit Sequence Alingment Editor (Ibis Biosciences, CA, USA) program segítségével vetettük össze.

3.2.3a. táblázat: A CAR gén exonjait az alábbi táblázatban látható primerek segítségével szekvenáltuk (Sigma-Aldrich, Németország):

Elnevezés (tartomány)	Termék mérete	Primer szekvenciák
exon 1 (29914-30343)	429 bázispár	CTggTTTA _g CTTA _{Aggg} AT/ CCTACTCACCCACTACTC

exon 2 (64118-64411)	293 bázispár	gTATCCCTCgCATCAATg/ gCgAgCAAggACATATCA
exon 3 (68902-69227)	325 bázispár	gTgTgTTTgTTTTTCCTCCT/ ACAAgTgCTgCTACTACA
exon 4 (76061-76393)	333 bázispár	AACCCAgAACCAACTgAT/ TCACACACACACCCCTACTA
exon 5 (77869-78045)	176 bázispár	CTTTTTCCTCCTTCCATAgA/ gAAACAAAACCACCAACAg
exon 6 (78457-78683)	226 bázispár	TAgCCTACCTTCAgTATC/ TCCTgTCTCACTTAATTACC
exon 7 (82595-82928)	333 bázispár	CATgTATTggggATTTTgC/ AAggAAAggAACACggAgA

4. Eredmények

4.1. Víruskimutatással kapcsolatos eredmények

4.1.1. Víruskimutatás PCR-rel

Az AdV3 szekvenciát a betegek 20%-ában tudtunk kimutatni. Az eredményeket az **4.1.1a.** táblázatban foglaltuk össze.

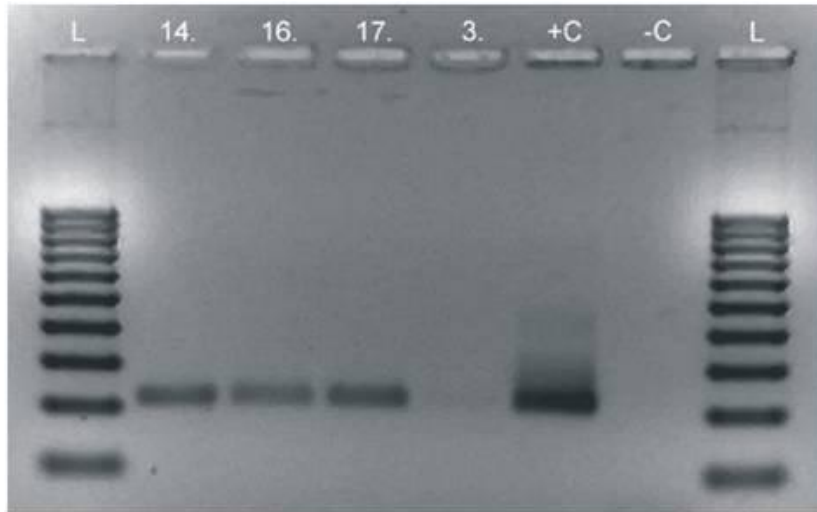
4.1.1a. táblázat: A vizsgált beteganyag AdV3-ra kapott eredménye.

	Nem	Kor (év)	CM típusa	JKEF	JKHF	BKEF	BKHF	BKAR
1.	férfi	57	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2.	férfi	51	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3.	nő	33	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
4.	férfi	37	inflammatorikus	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
5.	férfi	51	dilatatív	neg.	neg.	pozitív	neg.	neg.
6.	nő	53	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
7.	férfi	35	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
8.	férfi	17	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
9.	nő	53	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10.	férfi	40	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
11.	férfi	49	iszkémiás	pozitív	neg.	neg.	neg.	neg.
12.	férfi	41	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
13.	férfi	59	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
14.	nő	25	inflammatorikus	pozitív	neg.	neg.	pozitív	neg.
15.	férfi	54	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
16.	férfi	28	dilatatív	pozitív	pozitív	pozitív	neg.	neg.
17.	férfi	56	dilatatív	neg.	pozitív	neg.	neg.	neg.
18.	férfi	56	dilatatív	pozitív	neg.	neg.	neg.	pozitív
19.	férfi	49	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
20.	férfi	51	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

21.	férfi	47	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
22.	férfi	62	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
23.	férfi	62	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
24.	férfi	38	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
25.	nő	19	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
26.	férfi	53	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
27.	férfi	65	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
28.	férfi	54	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	<u>pozitív</u>
29.	férfi	55	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
30.	férfi	41	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
31.	nő	51	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
32.	férfi	53	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
33.	nő	33	dilatatív	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
34.	férfi	57	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
35.	nő	44	iszkémiás	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Az AdV3 esetében kapott pozitív minták a szív különböző régiójában helyezkedtek el, azonban a jobb kamrában kétszer olyan gyakorisággal fordult elő AdV3 vírus szekvencia a bal kamrához viszonyítva. Három beteg esetében egynél több régió adott pozitív eredményt. A vírus pozitív betegek közül négy dilatatív, kettő iszkémiás és egy inflammatorikus CM-ben szenvedett. Az **4.1.1b.** ábrán néhány AdV3 pozitív eredményt illusztráltunk.

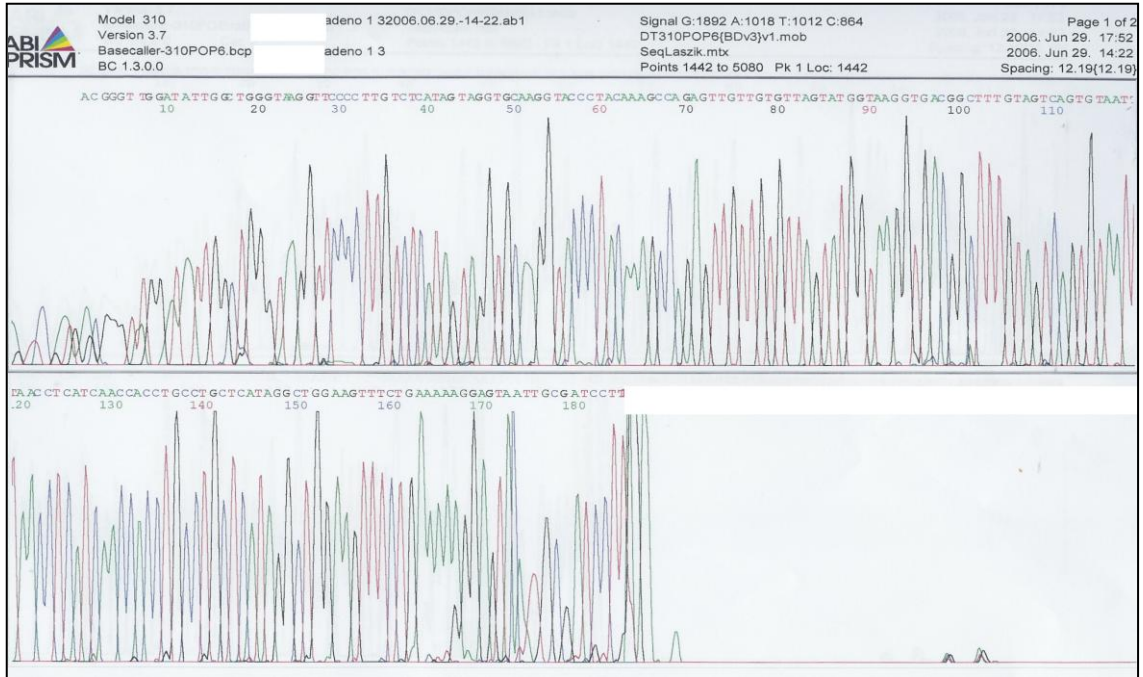
Az inflammatorikus CM-ben szenvedett fiatal nő szívének JKEF-ben és BKHF-ben kimutatott AdV3 mellett HHV6 szekvenciát is találtunk a BKAR régiójában. EV és AdV2 szekvenciát azonban egyik minta esetében sem tudtunk kimutatni. A vérminták és a kontroll szívizomminták tekintetében szintén negatív eredmény született. A betegektől származó vérminták vírus-negatív eredménye igazolja, hogy a szívizomban kimutatott vírus szekvenciák nem a vérből származó kontamináció következményei.



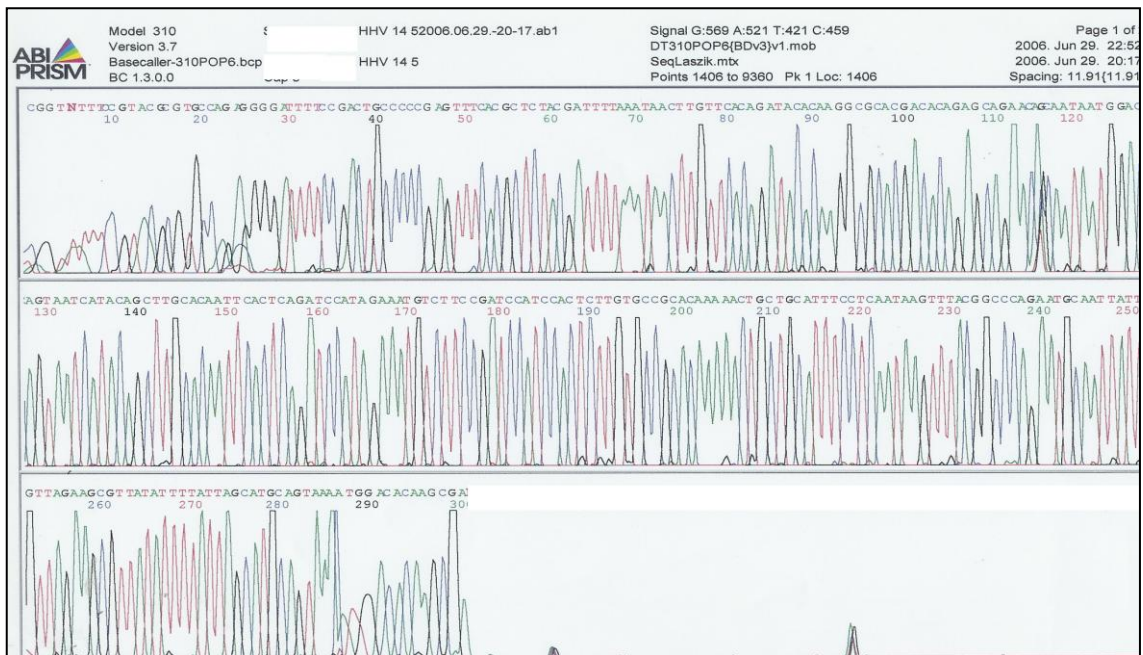
4.1.1b. ábra: AdV3 pozitív eredmények 1,75 %-os agaróz gélelektroforézis során kapott képe. Az első és az utolsó oszlopban (L) a 100 bázispár létra, míg a 2. (14. minta, inflammatorikus CM), 3. (16. minta, dilatatív CM) és 4. (17. minta, dilatatív CM) oszlopban AdV3 pozitív eredmények, az 5. oszlopban vírus-negatív (3. minta) eredmény, a 6. oszlopban a pozitív (+C), a 7. oszlopban pedig a negatív kontroll (-C) látható.

4.1.2. Vírus-pozitív minták szekvenálása

A vírus-pozitív minták szekvenálása során kapott elektroferogramok bizonyították, hogy a PCR során amplifikálódott, és a gélelektroforézis során kimutatott eredmény ténylegesen a kívánt vírus szekvenciákat jelentette. A **4.1.2a.** ábrán a közel 220 bázispárból álló AdV3 szekvencia, míg a **4.1.2b.** ábrán a 360 bázispárból álló HHV6 szekvencia látható.



4.1.2a. ábra: Az AdV3 vírus szekvencia elektroferogramja.

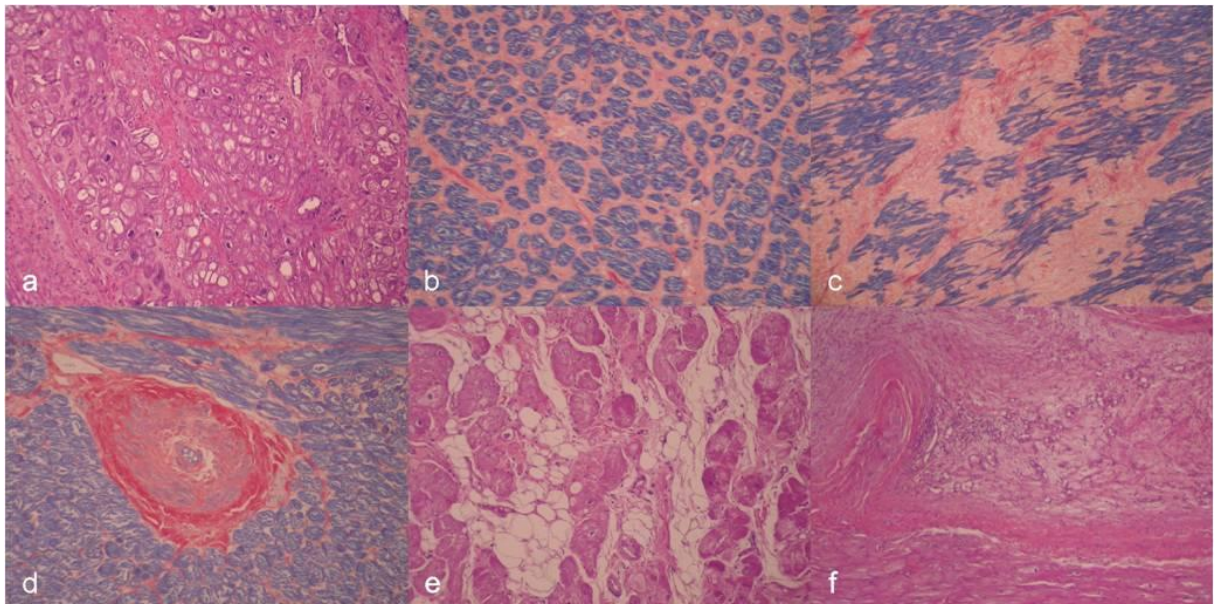


4.1.2b. ábra: A HHV6 vírus szekvencia elektroferogramja.

4.1.3. Hisztológiai eredmények

Az explantált iszkémiás szívek makroszkópos és mikroszkópos képe a szívizomzat és a szívizomsejtek különböző mértékű hipertrófiáját mutatta. Diffúz epikardiális koszorúér betegség jelei mellett korábbi szívizomelhalások területében extenzív fibrózis alakult ki, ami a bal kamrafal fokális elvékonyodását is okozta. Az iszkémiás szívizomzatban inflammatórikus infiltrátumokat nem detektáltunk.

A dilatatív CM-es betegek makroszkópos szempontból a betegség klasszikus képét mutatták. Mikroszkópos vizsgálat során különböző mértékű pericelluláris, fokális intersticiális fibrózist, valamint szubendokardiális fibrózist találtunk miocitolízis jelei mellett. Krónikus, főleg mononukleáris gyulladásos infiltrációt csak egy esetben találtunk az endokardium különleges megvastagodásával (laza kötőszövet felszaporodása, hajszálerekben gazdag, idült mononukleáris lobsejtekkel átjárt granulációs szövet). További kóros elváltozásként koszorúér felett izomhíd képződést, intramiokardiális kísér betegség szöveti jeleit, és hiperkontrakciós szívizom elhalást láttunk a vizsgált betegekben. (4.1.3.a-f. ábra).

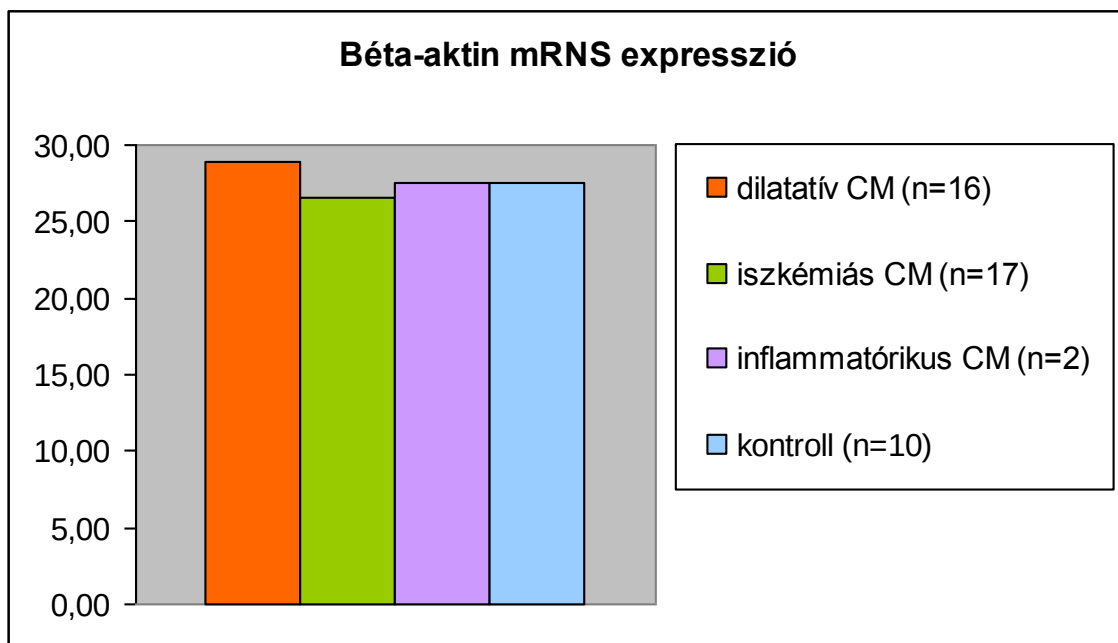


4.1.3a-f. ábra: a) Szubendokardiális miocitolízis (HE, 10x); b) Enyhe intersticiális/pericelluláris fibrózis (PTAH, 10x); c) Mérsékelt intersticiális fibrózis, (PTAH, 4x); d) Intramiokardiális kísér betegség a média fibromuszkuláris hipertrófiájával (PTAH, 10x); e) A bal kamrai szívizom zsírszövetes beszűrtsége (HE, 10x); f) Endokardiális idült gyulladás (HE, 4x).

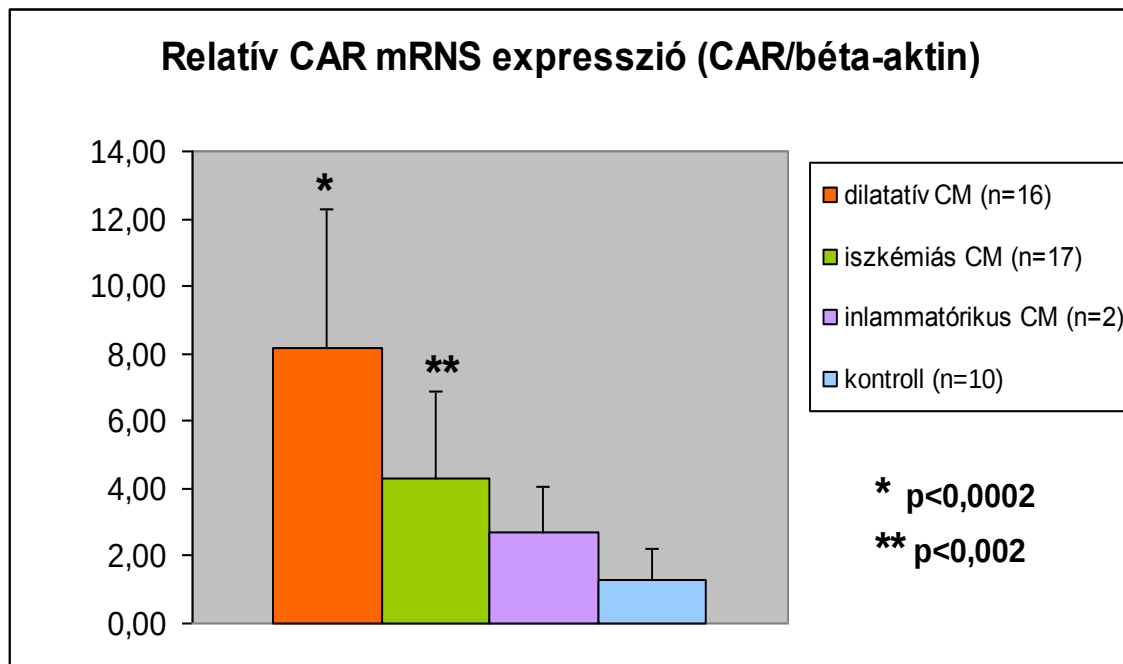
4.2. CAR expressziós vizsgálatának és szekvenálásának eredményei

4.2.1. CAR mRNS expressziós vizsgálata

A mRNS szintű vizsgálataink során 35 fentiekben leírt beteg és 10 kontroll személy szívizommintáját analizáltuk. A vizsgálatban alkalmazott béta-aktin endogén kontroll átlag C_T értéke közel azonos volt az összes minta tekintetében (**4.2.1a. ábra**). Szignifikáns különbség mutatkozott mind a dilatatív (8,16-szoros, $p < 0,0002$), mind az iszkémiás (4,33-szoros $p < 0,002$) CM-es szívizomminták esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva (**4.2.1b. ábra**). A két inflammatórikus CM esetében ugyan magasabb CAR mRNS expressziót kaptunk a kontroll csoporthoz viszonyítva, azonban alacsonyabb volt mind a dilatatív, mind az iszkémiás CM betegek értékeihez képest, és a kimutatott különbség nem érte el a $p = 0,05$ szignifikancia értéket ($p = 0,12$ és $p = 0,39$). Életkorral és nemmel kapcsolatos összefüggést nem sikerült kimutatni vizsgálataink során.



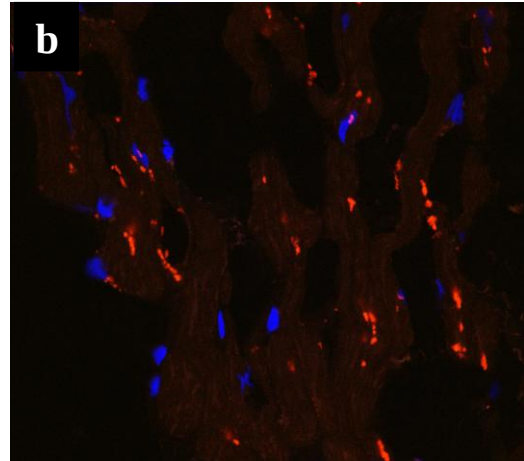
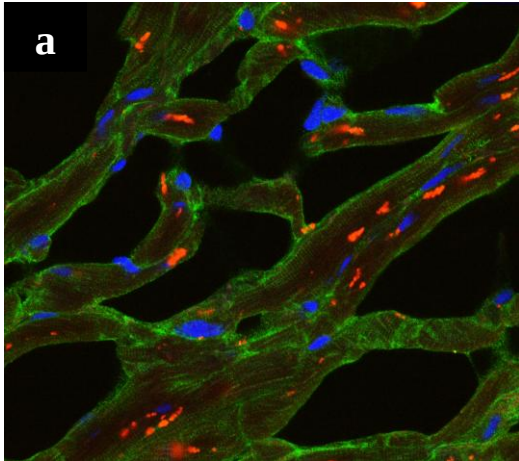
4.2.1a. ábra: Béta-aktin mRNS szintű expressziója dilatatív, iszkémiás, inflammatórikus CM-es és a kontroll csoportokban.



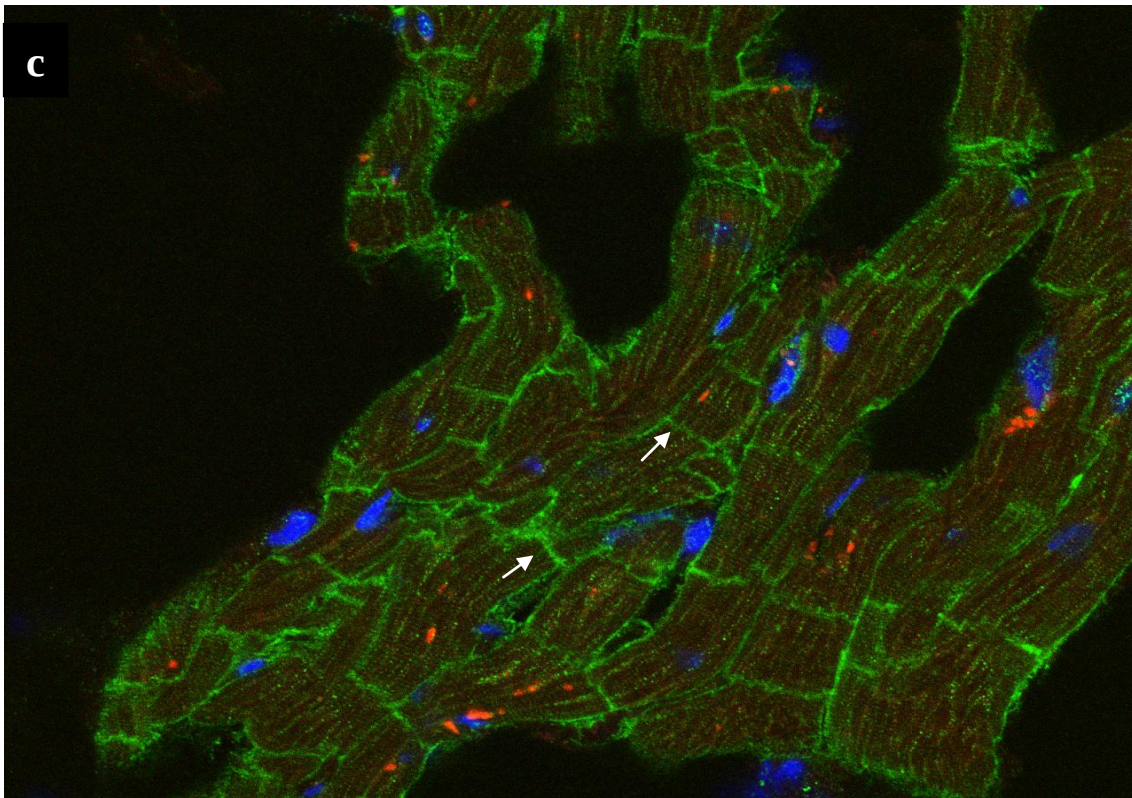
4.2.1b. ábra: CAR relatív mRNS expressziója dilatatív, iszkémiás, inflammatorikus CM-es és a kontroll csoportokban.

4.2.2. CAR immunfluoreszcens vizsgálata

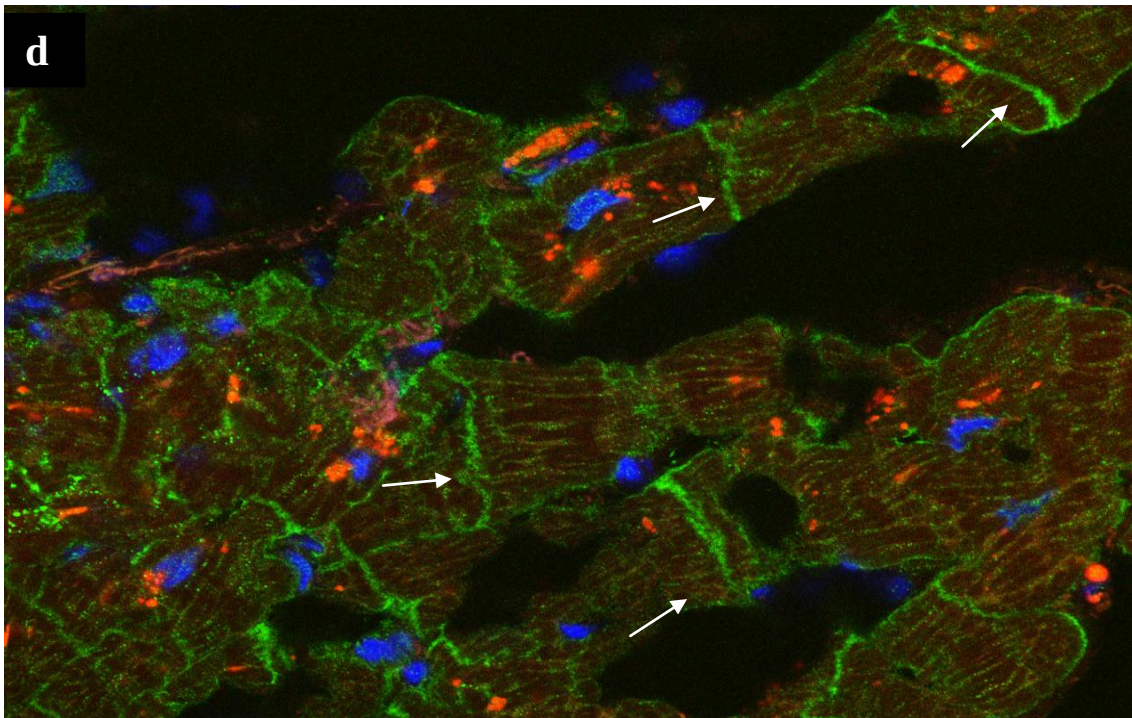
A CAR mRNS szintű vizsgálata során kapott eredményünkent kívántuk alátámasztani az elvégzett immunfluoreszcens vizsgálattal. Mindhárom betegcsoportból származó szívizommintákban sikerült magasabb CAR expressziót demonstrálni a kontroll mintákhoz képest. A dilatatív CM esetében az ICD régióban és a szarkolemmában volt kifejezettebb az immunreakció, míg a kontroll szívizommintákban az ICD régió egyáltalán nem, vagy csak csekély mértékben adódott CAR-pozitívnak (**4.2.2a. ábra**). Iszkémiás CM-es szívizommintákban szintén az ICD régiókban és a szarkolemmában volt pozitív reakció (**4.2.2d. ábra**) a dilatatív CM-es mintákhoz hasonlóan (**4.2.2c. ábra**). Ugyanakkor az inflammatorikus CM (**4.2.2e. ábra**) esetében is a dilatatív CM-hez hasonló kép mutatkozott talán erősebb membrán pozitivitással annak ellenére, hogy az mRNS szintű vizsgálat nem mutatott szignifikáns különbséget az egészséges kontrollokhoz képest.



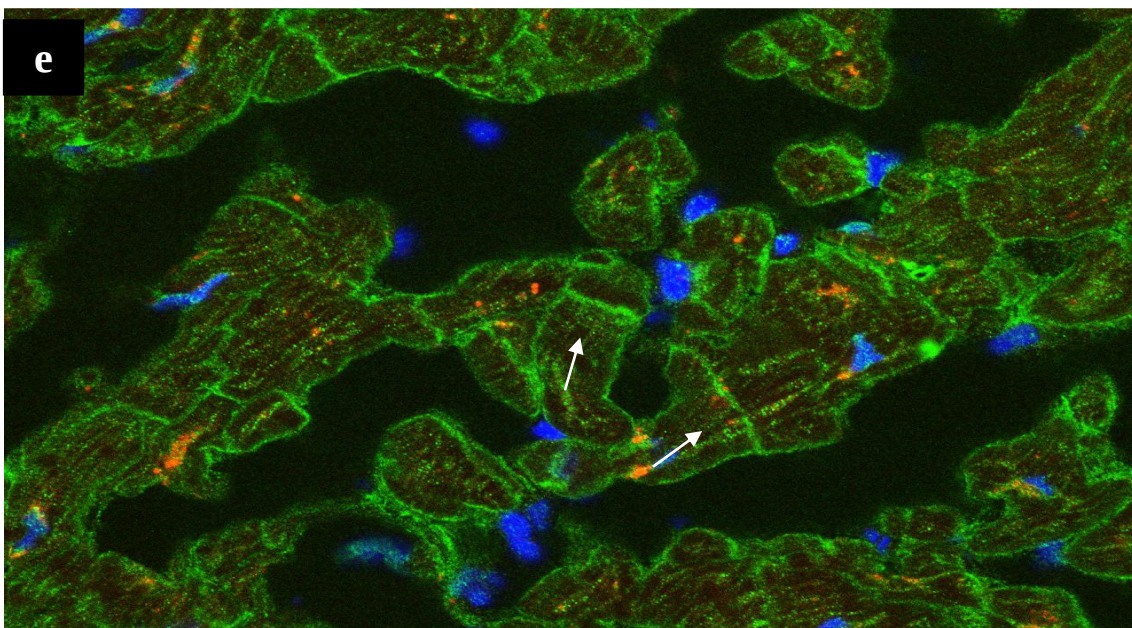
4.2.2a. ábra: CAR immunfluoreszcens vizsgálata kontroll szívizommintákban (60x). A zöld festék jelzi a CAR immunreakciót, a kék (DAPI) a magfestést. A CAR-jelölődés elsősorban a szívizomsejtek szarkolemmájára korlátozódott és nem vagy igen csekély mértékben látható az ICD régiókban pozitív reakció. A **4.2.2b. ábra:** a negatív kontroll (az elsődleges antitesttel való inkubálás kihagyásával készültek).



4.2.2c. ábra: CAR immunfluoreszcens vizsgálata dilatatív CM-es szívizommintában (60x). A nyilakkal jelölt ICD területek és a szarkolemma mutat erőteljes festődést (zöld).



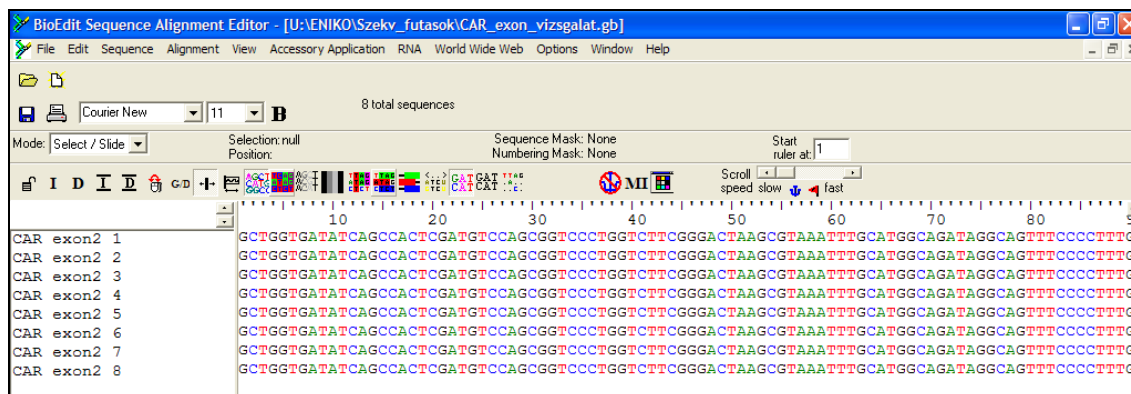
4.2.2d. ábra: CAR immunfluoreszcens (zöld) vizsgálata iszkémiás CM-es szívizommintában (60x). A nyilak jelölik az ICD régiókban a kontrollhoz képest kifejezettebb CAR immunreakciót, és a szarkolemmában is pozitív reakció mutatkozott.



4.2.2e. ábra: CAR immunfluoreszcens (zöld) vizsgálata inflammatorikus CM-es szívizommintában (60x). Az ICD és a szarkolemma is erőteljes immunreakciót adott. A nyilak az ICD régiókban kapott pozitív jelölődést mutatják.

4.2.3. CAR exonok szekvenálása

A CAR gén 7 exonjának szekvencia meghatározása során nem találtunk semmiféle eltérést az adatbázisban található exon szekvenciákhoz képest, mely esetlegesen befolyásolhatná a dilatatív, az iszkémiás vagy az inflammatorikus CM patogenezisét. A 4.2.3a. ábrán a Bioedit programmal analizált szekvenciákat ábrázoltuk.



4.2.3a. ábra: A CAR exonok szekvenálási eredményének Bioedit programmal történő analízise.

5. Megbeszélés

5.1. Víruskimutatás

Az első körben elvégzett retrospektív vizsgálatunk során négy vírus, AdV2, AdV3, EV, és HHV6 konzervatív régióit kerestük a betegek szívizommintáiban.

Az eddigi megfigyelések szerint elsősorban EV, továbbá AdV2, AdV5, és HHV6 vírusok játszanak szerepet MC és dilatatív CM kialakulásában (Bowles és mtsai 2003, Pauschinger és mtsai 1999). AdV3 szekvenciát sikerült a vizsgált CM-es betegek 20 %-ában kimutatnunk, mely gyakran idéz elő, az AdV2 és az AdV5 szerotípushoz hasonlóan, elsősorban légzőszervet érintő megbetegedést gyermekekben és fiatalok között (James és mtsai 2007). A szakirodalomban nem találtunk korábbi adatot arra vonatkozóan, hogy mutattak-e ki AdV3 szekvenciát beteg szívizomban.

A vérminták vírus-negatív eredménye igazolja, hogy nem a vérből származó kontamináció következménye a szívizomzatban kimutatott vírus szekvencia.

A vizsgálati anyagunkban szereplő 14-es beteg epikríziséből ismert, hogy a súlyos szívelégtelenség kialakulása miatt elvégzett szívtranszplantációt három hónappal megelőzően akut vírusos enteritisz zajlott le. Ebben a betegben két különböző vírus szekvenciát detektáltunk: AdV3 és HHV6 szekvenciát, mely a vírusinfekció (enteritisz) és a kialakult dilatatív CM közötti lehetséges kapcsolatot támasztja alá. A vizsgálataink során sem EV, sem AdV2 szekvenciát nem sikerült kimutatni.

Korábbi tudományos közleményekből ismert, hogy a HHV6 képes fatális kimenetelű MC-t előidézni (Fukae és mtsai 2000, Yoshikawa és mtsai 2001). Amennyiben a HHV6 más vírussal együtt fordult elő, mint PVB19-cel akut MC-ben, a betegség klinikai lefolyása jelentősen rosszabb volt, összehasonlítva a csak HHV6, vagy csak PVB19 által előidézett betegség esetében (Mahrholdt és mtsai 2006). A 14-es beteggel kapcsolatban az a hipotézisünk, hogy a szívizomban kimutatott AdV3 és HHV6 szekvenciák együttes jelenléte felelős lehetett a szívatültetést indukáló rövid idő alatt megnyilvánuló szívelégtelenségnek. Korábbi közlemény is beszámolt kettős infekció előfordulásáról méghozzá igen magas százalékban (27,3 %), melyből a PVB19 és a HHV6 szekvencia együttes jelenléte adta a nagyobb részt (15,8 %) (Kühl és mtsai 2005). Egy nyomonkövetéses vizsgálat során, azokban a betegekben, ahol a két vírus

együttes jelenlétét detektálták, javult azon betegek hemodinamikai állapota, ahol az egyik vírus az IFN kezelés hatására eliminálódott a szervezetből (Stille Siegener és mtsai 1995).

A további 6 AdV3-pozitív betegből 4 dilatatív és 2 iszkémiás CM-ben szenvedett. A dilatatív CM-es betegek esetében a szövettani vizsgálat során nem találtunk gyulladásra utaló jelet. Szívelégtelenségben szenvedő betegek szívizomzatából nagy arányban mutattak ki vírus szekvenciákat annak ellenére, hogy bármilyen jelét detektálták volna szöveti gyulladás jelenlétének (Kühl és mtsai 2005, Kuethe és mtsai 2007). Már korábban felvetődött, hogy a rutinszerűen elvégzett EMB érzékenysége nem tekinthető elegendőnek a szívizomban fennálló gyulladás detektálására (Chow és mtsai 1989). Klinikailag dilatatív CM gyanús betegek (n=245) szívizom biopsziájában detektált vírus szekvenciák előfordulása független volt a szívizomba infiltráló limfociták és makrofágok számától (Kühl és mtsai 2005).

A vizsgálataink során kimutatott vírus szekvenciák elhelyezkedése alapján (JKEF és JKHF mintákban kétszer olyan gyakran fordult elő AdV3 szekvencia) elmondhatjuk, hogy a jobb kamrai szeptum régió, mint mintavételezési hely megfelelőnek tartható, mivel az EMB a jobb kamra szeptális régiójából készül az esetek döntő részében gyakorlati megfontolásból. Ugyanakkor a biventrikuláris EMB megnövelheti az MC diagnosztikai érzékenységi küszöbét (Frustaci és mtsai 1994).

A vizsgálataink alapján elmondható, hogy a szívizom vírusfertőzöttsége fokális, melyet már Pauschinger és munkatársai is felvetettek (Pauschinger és mtsai 1999). Egereken végzett tanulmányban Cocksackie B3 vírus először a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben szaporodott, majd fokális replikációt mutatott a szívizomban (Gomez és mtsai 1991). A vírus szívizomban való fokális megjelenésének a kiküszöbölésére elméletileg a többszörös mintavételezés jelenthetne megoldást, azonban ennek gyakorlati megvalósíthatósága korlátokba ütközik.

Vizsgálati anyagunkban két iszkémiás CM-es beteg esetében találtunk AdV3 szekvenciát. Egyre növekvő számú adat áll rendelkezésre, hogy ateroszklerózis kialakulásában a vírus infekciónak potenciális szerepe lehet, miszerint kimutatható látens perzisztencia és vírus nukleinsav jelenléte ateroszklerotikus léziókban (Caruso és mtsai 2002, Horváth és mtsai 2000, Ismail és mtsai 1999). Egy 1968-as közleményben számoltak be arról, hogy Cocksackie B4 vírus infekció akut koronáriát idézett elő

állatkísérletben (Sohal és mtsai 1968). A 90-es években EV szekvenciát mutattak ki végstádiumú krónikus koronária miatt szívátültetésre került betegekben (Andreoletti és mtsai 1996, Petitjean és mtsai 1992) és iszkémiás eredetű szívbetegségben is (Andreoletti és mtsai 1995, Petitjean és mtsai 1992), mely az EV szerepének jelentőségére utalhat mind akut, mind krónikus iszkémiás szívbetegségekben (Roivainen és mtsai 1998). A fentiek alapján, melyet a saját eredményeink is alátámasztanak, nem tartható helyesnek kontroll csoportként való alkalmazásuk ilyen jellegű vizsgálatokban.

A vizsgálataink során nem sikerült EV szekvenciát kimutatni a betegek szívizommintáiban, mely összhangban van néhány korábban közölt eredményekkel, miszerint dilatatív CM-ben és ismert eredetű szívbetegségben (iszkémiás, hipertrófiás, kongenitális, valvuláris) (de Leeuw és mtsai 1998, Mahon és mtsai 2001) nem tudtak EV szekvenciát kimutatni. Ugyanakkor más közleményekben *in situ* hibridizációt és *slot blot* hibridizációs vizsgálatot végezve igen magas százalékban (~50 %) detektáltak EV szekvenciát dilatatív CM-es szívizomból származó EMB-n (Kandolf 1988, Bowles és mtsai 1989). Egy 773 betegen (624 MC, 149 dilatatív CM) elvégzett vizsgálatban AdV genomot detektáltak a legnagyobb arányban fagyasztott, formalin fixált illetve paraffinba ágyazott szívizommintákban, míg EV szekvencia kisebb mértékben fordult elő ezekben a mintákban (Bowles és mtsai 2003). Hasonló eredmény mutatkozott egy korábbi vizsgálatban, ahol MC-ben és dilatatív CM-ben szenvedő gyerekek szívizomzatában nagyobb arányban detektáltak AdV, mint EV szekvenciát (Griffin és mtsai 1995). Egy másik közleményben arról számoltak be, hogy EV (9,4 %) és AdV (2 %) szekvenciák viszonylag kis, míg HHV6 (21,6 %) és PBV19 (51,4 %) szekvenciák nagy arányban fordultak elő a vizsgált betegek szívizomzatában (Kühl és mtsai 2005). A közleményekben szereplő eredmények igen ellentmondóak, melyre egyértelmű magyarázatot a mai napig nem sikerült adni. Annak a megfigyelésnek a háttérében, hogy bizonyos esetekben igen magas százalékban mutatható ki EV szekvencia a szívizomban (Weiss és mtsai 1992, Andreoletti és mtsai 1996), míg más esetekben egyáltalán nem (de Leeuw és mtsai 1998), vagy csak alacsony százalékban (Muir és mtsai 1996), állhat egyrészt mintavételezési hiba, másrészt a vizsgált betegcsoportok különbözőképpen történő definiálása, így nem alkotnak azonos vizsgálati csoportokat az egyes tanulmányokban. Az EV és AdV okozta MC előfordulási gyakoriságával

kapcsolatban nagy eltérés mutatkozott mind a különböző országok, mind az adott országra jellemző higiéniai körülmények tekintetében (Grumbach és mtsai 1999, Leonard 2004, Huhn és mtsai 2005).

Egy közelmúltban elvégzett vizsgálatban 8 halálos kimenetelű MC-s gyermek közül 5-ben AdV5, 3 MC-n átesett gyermekben AdV1 szekvenciát detektáltak (Savon és mtsai 2008), mely azért meglepő, mert korábbi vizsgálatokban a C szerotípusba tartozó AdV2 és AdV5 számított kardiovirulens vírusnak.

Egy korábbi tanulmányban egyértelműen kimutatható volt a vírus perzisztencia és a balkamra funkció leromlása közötti kapcsolat, mivel a korábban kimutatott vírus szekvenciák spontán eltűnése együtt járt a bal kamra hemodinamikai jellemzőinek javulásával (Kühl és mtsai 2005). Egy vizsgálat során vírus-pozitív dilatatív CM-es esetekben rövidebb életkort figyeltek meg a vírus-negatív eseteknél tapasztaltakkal szemben (Why és mtsai 1994).

A vizsgálati eredményeink alapján az esetek kis száma miatt messzemenő következtetéseket nem lehet levonni, ezért mindenképpen folytatni kívánjuk a mintagyűjtést a nagyobb esetszám elérése érdekében. A fenti eredményekkel kapcsolatban felmerül a kérdés, hogy vajon a kimutatott vírus szekvenciák hozzájárultak-e a betegség kialakulásához, vagy akár a kórfolyamat romlásához. Ennek tisztázása távolról sem olyan egyszerű, hiszen egyrészt a beteg orvosnál való megjelenése, illetve kivizsgálása az esetek döntő többségében a betegség előrehaladott állapotában történik, továbbá nehezítő körülmény, hogy az EMB elvégzése sem indokolt, amennyiben a betegség kezelésének kiválasztása szempontjából mellékes a biopsza eredménye.

A kapott eredményünk kapcsán érdemesnek tartanák, tekintettel a gyerekkori AdV fertőzés gyakoriságára, az echokardiográfiás szűrővizsgálat elvégzését kezdeményezni gyermekkorban igazolt AdV fertőzést követően.

5.2. CAR expressziós vizsgálata

A közelmúltban Cocksackie és AdV C szerotípusú vírusok receptoraként azonosított CAR expressziós vizsgálata során mRNS szinten szignifikánsan magasabb volt a CAR expressziója mind a dilatatív, mind az iszkémiás betegcsoportban. Az

immunfluoreszcens képen különösen az ICD régiók festődtek erőteljesen dilatatív, iszkémiás és inflammatórikus CM-es betegcsoportokban a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Annak ellenére, hogy számos irodalmi adat szól a CAR eltérő expressziós mintázatáról, jelenleg is tisztázatlan a fehérje fiziológiai funkciója (Ito és mtsai 2000). Jelenleg két hipotézis létezik a CAR fehérje szívizomban való szerepének magyarázatára: 1) Az alacsony CAR expresszió egészséges és nem-dilatatív CM-es szívizomban rezisztenssé teheti a szívet a CAR-dependens vírusokkal szemben, míg a magas expressziója megnövelheti a CAR-dependens vírusok bejutását a sejtekbe. 2) A CAR fehérje szerepet játszhat a szívizomsejtek közötti kapcsolat fenntartásában (Noutsias és mtsai 2001). Az első hipotézist alapul véve elképzelhető, hogy a vírus-pozitív dilatatív CM-es esetekben az infekció a betegség progressziója során következik be és nem a betegség indukálásában szerepel. Egy állatkísérlet során patkányok szívében az embrionális fejlődést követően jelentős mértékű CAR expresszió csökkenést tapasztaltak (Fechner és mtsai 2003). Szintén a sejtkapcsoló szerepére utalhat az is, hogy magas CAR expressziót figyeltek meg embrionális egerek központi és perifériás idegrendszerében (Dorner és mtsai 2005).

A vizsgálati eredményeink alapján az első csoport (dilatatív CM) a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns különbséget mutatott a CAR mRNS expressziójában a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően. Ugyanakkor az általunk vizsgált iszkémiás CM-es betegcsoportban kapott magas expresszió szemben áll régebben demonstrált eredménnyel, ahol nem-dilatatív CM-ben (iszkémiás CM) nem tapasztalták CAR megjelenését a szívizomsejtek felszínén (Noutsias és mtsai 2001), mely az iszkémiás eredetű szívbetegség és a vírus infekció közötti lehetséges összefüggés fennállását cáfolná. Egy későbbi vizsgálatban ezzel szemben megemelkedett CAR expressziót mértek mRNS szinten iszkémiás CM esetében (Sasse és mtsai).

A CAR exonok szekvenálása során nem találtunk olyan eltérést, mely a CAR meghatározó szerepét jelezhetné dilatatív, iszkémiás és inflammatórikus CM patogenezisében. Sajnálatos módon a betegek familiáris háttérével kapcsolatban nem rendelkezünk megfelelő információval. Egy 2002-es tanulmányban szerzett és

familiáris eredetű MC/dilatatív CM-es betegekben szintén nem találtak mutációt néhány polimorfizmustól eltekintve (Bowles és mtsai 2002).

Egy patkányokon végzett állatkísérlet során demonstrált autoimmun MC-ben indukálódott CAR expressziója a betegség kezdetén nagyon alacsony, vagy nem detektálható mértékű volt, majd az MC aktív fázisában jelent meg kifejezetten magas mértékben, végül a krónikus fázisban már újra lecsökkent (Ito és mtsai 2000). A gyulladásos infiltrátumok megjelenése a CAR expressziót néhány nappal megelőzte, melyből arra következtettek, hogy a CAR megjelenése az MC gyulladásos fázisával vagy a sérült szívmusculus regenerálódásával lehet kapcsolatban (Ito és mtsai 2000).

Egerekben szívmusculus-sejt-specifikus CAR deléciót létrehozva a deléciót homozigóta formában hordozó egérembriók a 12. napon elpusztultak, a megvastagodott balkamra falban intenzív osztódást mutató szívmusculus-sejteket figyeltek meg ezekben az embriókban. Továbbá az N-myc perzisztáló expressziót mutatott, mely létfontosságú a szívmusculus fejlődésében az embrionális korszak elején. Elképzelhető, hogy az N-myc közvetlenül felelős a kamrában kialakult hiperpláziáért (Chen és mtsai 2006).

Érdekes megfigyelés, hogy rekombináns CAR expressziója jelentős mértékben megnövelte szívmusculus sejtenyészetben a sejtek vírusfelvételét (Noutsias és mtsai 2001) sugallva ezzel azt az elképzelést, hogy a CAR jelenléte megnövelheti a szívmusculus vírusfertőzésre való hajlamát. Ebből következően a transzfekció sikeressége szoros összefüggésben állhat a sejtfelületen elhelyezkedő CAR koncentrációjával (Bergelson és mtsai 1997), azonban későbbi vizsgálat során kiderült, hogy a magas CAR expresszió nem áll egyenes arányban a különböző adenovírus vektorral történő transzfekció hatékonyságával (Lucas és mtsai 2003), ahogy Fechner és munkatársai sem igazolták a transzfekciós eredmények és a sejtfelületen elhelyezkedő CAR illetve α_v -integrin expressziós mintázata közötti összefüggést (Fechner és mtsai 1999). Ebből következően nem egyértelműsíthető, hogy magas CAR expresszió esetén biztosan bekövetkezik vírusfertőzés, ahogy a víruskimutatási eredményeinkből is kitűnik.

Feltételezhetően a CAR más vírusreceptorokkal együtt intracelluláris szignalizációs útvonalakat aktivál, mellyel befolyással lehet a betegség kimenetelére (Selinka és mtsai 2004). Egy közelmúltban végzett vizsgálat során egerekben az embrionális fejlődés során túlexpresszáltatták a CAR-t, mely CM-et idézett elő és módosította a kardiális béta-katenin és N-kadherin expresszióját, továbbá a béta-katenin

sejtmagba történő transzlokációját és a hozzá kapcsolódó szignalizációs jelátviteli folyamatok beindítását idézte elő (Caruso és mtsai 2010). A jelátviteli folyamatokban a CAR lehet egyfajta jel a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) aktiválására, melyek jelátviteli közvetítőként szabályozzák a génátírást a sejtmagba történő transzlokációjukat követően. Erre a következtetésre jutottak abból, hogy felnőtt egerekben a CAR túlexpresszáltatására inflammatorikus CM fejlődött ki, mely a MAPK jelátviteli útvonal aktiválódásával és proinflammatorikus citokinek (TNF-alfa, IL-1-béta, IL-6 és IFN-gamma) expressziójával járt együtt (Yuen és mtsai 2011). A gyulladásos infiltrátumok, melyeket a CAR-t túlexpresszáló egerekben figyeltek meg, NK sejtekből és makrofágokból álltak (Yuen és mtsai 2011). Ez utóbbi eredményekből úgy tűnik, hogy a CAR fehérje feltehetően kettős szereppel bírhat az MC patogenezisében: 1) vírus receptor, mellyel lehetőséget biztosít a vírus megkötésére; 2) az immunrendszer effektor sejtjeit és a citokin/kemokin expressziót aktiváló jeleket indukál függetlenül a vírus infekciótól (Yuen és mtsai 2011).

Számos állatkísérletes modellben vizsgálták a CAR lehetséges szerepét, azonban mindenképpen érdekes lenne feltérképezni, tekintettel a kevés számú humán mintákon végzett vizsgálatra, hogy milyen jelátviteli folyamatok aktiválódhatnak dilatatív, iszkémiás vagy akár inflammatorikus CM-es szívmusclesejtekben. Továbbá érdemes lenne tisztázni nyomonkövetéses vizsgálatban, ismert balkamra megnagyobbodással és azzal nem rendelkező személyek esetében (ahol családi halmozódást figyeltek meg), hogy a betegség progressziója során mely fázisban kezd el expresszálni a CAR fehérje, illetve fennáll-e genetikai predispozíció a CAR fehérje expresszió mértékével kapcsolatban.

6. Következtetések

1. Vizsgálataink során egy új adenovírus típusról, az AdV3-ról bizonyosodott be, hogy CM-es betegek szívizomzatában jelen van. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy EV és AdV2 szekvencia hiánya mintavételezési hiba következményének vagy a populáció genetikai sajátosságának tudható be.
2. Az iszkémiás CM-es betegek esetében is kimutatható AdV3 szekvencia.
3. Az iszkémiás CM-es szívizommintákban kimutatott AdV3 szekvencia alapján nem tekinthető az iszkémiás betegcsoport kontrollcsoportnak az ilyen jellegű vizsgálatokban.
4. A vírus-pozitív eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a jobb kamra szeptális régiójából származó EMB alapján igazolható vírus jelenléte.
5. A szövettani vizsgálati eredményeinkkel megerősítettük azt a korábbi megfigyelést, miszerint az EMB-ből történő szövettani vizsgálat érzékenysége alacsony.
6. Magasabb CAR expressziót detektáltunk mindhárom betegcsoportban, azonban szignifikáns mértékben csak a dilatatív és az iszkémiás betegekben adódott különbség a kontroll csoporthoz képest. Az mRNS szintű CAR expressziót az immunfluoreszcens vizsgálat is igazolta a vizsgált betegcsoportokban. A kapott eredmény arra enged következtetni, hogy a CAR feltehetően a sejt-sejt közötti kapcsolat fenntartásában, és a szöveti regenerálódásban bírhat szereppel.

7.1. Összefoglalás

Nagy jelentőséget tulajdonítanak MC és dilatatív CM esetében a vírus infekciók szerepének. Az elmúlt évtizedekben az EV-k közé tartozó Coxsackie vírusokról bizonyosodott be kórokozó szerepük ezen megbetegedésekben, azonban napjainkra a szívizmot érintő vírusok közé sorolják az AdV-kat, HHV6-ot és a PVB19-et.

Vizsgálataink során, szemben korábbi közleményekkel, nem detektáltunk sem EV, sem AdV2 vírus szekvenciát a vizsgált betegek szívizomzatában, azonban tudomásunk szerint eddig nem vizsgált AdV3 szekvenciát sikerült kimutatni a betegek 20%-ában. Ezek közül egy inflammatórikus CM beteg a transzplantáció előtt 3 hónappal egy vírusos enteritiszen esett át, ebben a betegben feltételezésünk szerint az AdV3 és HHV6 szekvencia együttes előfordulása lehetett felelős a hirtelen fellépő súlyos szívelégtelenség kialakulásáért.

Érdekes eredmény, hogy nemcsak dilatatív CM-es betegekben, hanem két iszkémiás CM-es betegben is AdV3 pozitív eredményt kaptunk.

A szövettani kiértékelés során csak az egyik inflammatórikus esetben találtuk gyulladás jelét, azonban a dilatatív és az iszkémiás CM-es minták tekintetében nem detektáltunk ilyen jellegű eltérést.

Szándékunk volt az EV és AdV vírusok gazdasejtbe jutásához használt CAR expressziós vizsgálata azzal a céllal, hogy kimutatható-e eltérés a beteg és az egészséges kontroll csoportok között. A CAR mind mRNS, mind fehérje szinten magasabb expressziót mutatott a kontroll csoporthoz képest, azonban nem csak a korábbi közlemények alapján előzetesen feltételezett dilatatív CM-ben, hanem az iszkémiás CM csoportban is, míg az inflammatórikus CM-ben a várttal ellentétben nem volt szignifikáns a különbség. Az immunfluoreszcens vizsgálat igazolta, hogy a szívizomsejtek sejtmembránjára, elsősorban az ICD területre korlátozódott a CAR fehérje megjelenése, mely inflammatórikus CM esetében is igaznak bizonyult.

A CAR gén exonjainak szekvenálása során nem fordult elő mutáció, vagy polimorfizmus, mely a CAR dilatatív, iszkémiás vagy inflammatórikus CM patogenezisében meghatározó szerepét jelezné.

7.2. Summary

Our aim was to screen heart-transplanted dilated, inflammatory and ischemic CM patients for cardiotropic viruses (EV, AdV and HHV6). In addition, mRNA and protein expression pattern of a virus receptor (CAR) was examined. We sequenced all seven exons of CAR, as well.

In our results EV and AdV2 sequences were not detected in the examined myocardiums. Nevertheless, after a thorough research of the literature, we did not find any previous data described by others indicating the presence of AdV3 in the myocardium. We suppose that in case 14, the coexistence of the two viruses in the myocardium may be responsible for the rapid development of heart failure indicating transplantation. Interestingly, two ischemic CM showed virus-positiv result in the myocardium. In addition, AdV3 was detected not only in dilated CM patients, but also in two of the patients with ischemic CM.

Any sign of inflammation could only be verified by immunhistology in one of the inflammatory CM cases; neither did dilated CM cases, nor did ischemic CM cases present this histological alteration.

An additional aim was to measure mRNA and protein expression of CAR, used by EVs and AdVs to entry the host cells, in our patient population to demonstrate its possible difference between patients and control groups. The obtained high CAR mRNA expression both in dilated and ischemic CM might prove greater role of CAR as maintaining a cell-to-cell connection and tissue regeneration. Interestingly, previous publications did not demonstrate high CAR expression in ischemic CM. The immunfluorescence staining showed high CAR expression in the intercalated discs mainly in dilated CM, but also in ischemic CM and even in inflammatory CM, in spite of relatively low CAR mRNA expression in the latter case.

Sequencing result of CAR exons did not show any mutations or polymorphisms that could explain a determinant role of CAR in dilated CM.

8. Irodalomjegyzék

Andreoletti L, Wattré P, Decoene C, Lobert PE, Dewilde A, Hober D. (1995) Detection of enterovirus-specific RNA sequences in explanted myocardium biopsy specimens from patients with dilated or ischemic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*, 21: 1315-7.

Andreoletti L, Hober D, Decoene C, Copin MC, Lobert PE, Dewilde A, Stankowiac C, Wattré P. (1996) Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in endomyocardial tissue of patients with chronic cardiac diseases. *J Med Virol*, 48 (1): 53-9.

Angelini A, Crosato M, Boffa GM, Calabrese F, Calzolari V, Chioin R, Daliento L, Thiene G. (2002) Active versus borderline myocarditis: clinicopathological correlates and prognostic implications. *Heart*, 87: 210-5.

Archard L, Bowles NE, Olsen EGJ, Richardson PJ. (1987) Detection of persistent coxsackie B virus RNA in dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Eur Heart J*, 8: 437-40.

Asher D, Cerny A, Weiler S, Horner J, Keeler M, Neptune M, Jones SN, Bronson RT, Depinho RA, Finberg RW. (2005) Coxsackie and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis* 42: 77-85.

Aretz HT. (1987) Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol*, 18 (6): 619-24.

Baboonian C, Treasure T. (1997) Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart*, 78 (6): 539-43.

Baboonian C and McKenna W. (2003) Eradication of viral myocarditis: is there hope? *J Am Coll Cardiol*. 42 (3): 473-6.

Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU. (1999) Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med*, 5: 320-6.

Badorff C, Knowlton KU. (2004) Dystrophin disruption in enterovirus-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol*, 193: 121-6.

Baig MK, Goldman JH, Caforio AL, Coonar AS, Keeling PJ, McKenna WJ. (1998) Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol*, 31: 195-201.

Baughman KL, Wynne J: Myocarditis. In: Braunwald E (szerk.), *Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*. Elsevier Saunders, USA, 2005 (7): 1697-717.

Baughman KL. (2006) Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation*, 113: 593-5.

Beisel KW, Srinivasappa J, Olsen MR, Stiff AC, Essani K, Prabhakar BS. (1990) A neutralizing monoclonal antibody against Coxsackievirus B4 cross-reacts with contractile muscle proteins. *Microb Pathog*, 8: 151-6.

Berencsi Gy, Szendrői A, Kapusinszky B. Humán picornavírusok. In: Berencsi Gy (szerk.), *Orvosi molekuláris virológia*. Convention Budapest Kft., Budapest, 2004: 180-92.

Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, Finberg RW. (1995) Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol*, 69: 1903-6.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275 (5304): 1320-3.

Berkovich S, Rodriguez-Torres R, Lin JS. (1968) Virologic studies in children with acute myocarditis. *Am J Dis Child*, 115: 207-12.

Biron CA. (1999) Initial and innate responses to viral infections-pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol*, 2: 374-81.

Borman AM, Michel YM, Malnou CE, Kean KM. (2002) Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction. *J Biol Chem*, 277 (39): 36818-24.

Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC. (1986) Detection of Coxsackie-B-virus specific RNA sequence in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 1: 140-3.

Bowles NE, Rose ML, Taylor P, Banner NR, Morgan-Capner P, Cunningham L, Archard LC, Yacoub MH. (1989) End-stage dilated CM. Persistence of EV RNA in myocardium at cardiac transplantation and lack of immune response. *Circulation*, 80: 1128-36.

Bowles NE, Kearney D, Ni J, Towbin JA. (1997) Association of adenovirus infection with apoptosis in the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Pediatr Res*, 41: 19a.

Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Makar KA, Li H, Gibson J, Soto F, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Pauschinger M. (2002) Analysis of the coxsackievirus B-adenovirus receptor gene in patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab*, 77 (3): 257-9.

Bowles NE, Ni J, Kearny DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. (2003) Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol*, 42 (3): 466-72.

Brandenburg RO, Chazov E, Cherian G, Falase AO, Groszogaat, Kawai C, Loogen F, Judez MV, Orinius E, Goodwin JF, Olsen EGJ, Oakly CM, Pisa Z. (1980) Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of CMs. *Br Heart J*, 44: 672-3.

Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. (1997) Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev*, 10: 521-67.

Burgert HG, Maryanski JL, Kvist S. (1987) 'E3/19k' protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 1356-60.

Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. (2002) Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*, 4: 411-7.

Calabrese F, Rigo E, Milanesi O, Boffa GM, Angelini A, Valente M. (2002) Molecular diagnosis of myocarditis and dilated cardiomyopathy in children: clinicopathologic features and prognostic implications. *Diagn Mol Pathol*, 11 (4): 212-21.

Caruso A, Rotola A, Comar M, Favilli F, Galvan M, Tosetti M, Campello C, Caselli E, Alessandri G, Grassi M, Garrafa E, Cassai E, Di Luca D. (2002) HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *J Med Virol*, 67 (4): 528-33.

Caruso A, Favilli F, Rotola A, Comar M, Horejsh D, Alessandri G, Grassi M, Di Luca D, Fiorentini S. (2003) Human herpesvirus-6 modulates RANTES production in primary human endothelial cell cultures. *J Med Virol*, 70: 451-8.

Caruso L, Yuen S, Smith J, Husain M, Opavsky MA. (2010) Cardiomyocyte-targeted overexpression of the coxsackie-adenovirus receptor causes a cardiomyopathy in association with beta-catenin signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 48 (6): 1194-205.

Charny C, Lepine P, Lelong M, Le TV, Satge P, Virat J. (1958) Severe and fatal pneumonia in infants and young children associated with adenovirus infections. *Am J Epidemiol*, 67 (3): 367-78.

Chen J, Zhou B, Yu Q, Shin S, Jiao K, Schneider M, Baldwin HS, Bergelson JM. (2006) Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. *Circ Res*, 98: 923-30.

Chow LH, Radio SJ, Sears TD, McManus BM. (1989) Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, 14 (4): 915-20.

Chow LH, Beisel KW, McManus BM. (1992) Enteroviral infections of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest*, 66: 24-31.

Clark DA. (2000) Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol*, 10: 155-73.

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (26): 15191-96.

Comar M, D'Agaro P, Campello C, Poli A, Breinholt JP, Towbin JA, Vatta M. (2009) Human herpes virus 6 in archival cardiac tissues from children with idiopathic dilated cardiomyopathy or congenital heart disease. *J Clin Pathol*, 62 (1): 80-3.

Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kühl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. (2007) The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the ACC, AHA and the European Society of Cardiology endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 28: 3076-93.

Coyne CB, Bergelson JM. (2005) CAR: A virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev*, 57: 869-82.

Dec GW, Palacios IF, Fallon JT, Aretz HT, Mills J, Lee DC, Johnson RA. (1985) Viral myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med*, 312 (14): 885-90.

de Leeuw N, Melchers WJ, Balk AH, de Jonge N, Galama JM. (1998) No evidence for persistent enterovirus infection in patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis*, 178: 256-9.

Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. (2008) Acute viral myocarditis. *Eur Heart J*, 29 (17): 2073-82.

Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Padosch SA, Haag C, Kandolf R, Madea B. (2004) Role of virus-induced myocardial affections in sudden infant death syndrome: a prospective postmortem study. *Pediatr Res*, 55 (6): 947-52.

Dorner AA, Wegmann F, Butz S, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Mack A, Nasdala I, August B, Westermann J, Rathjen FG, Vestweber D. (2005) Coxsackievirus-

adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci*, 118 (Pt 15): 3509-21.

Easton A, Eglin R. (1988) The detection of coxsackievirus RNA in cardiac tissue by in situ hybridization. *J Gen Virol* 69: 292-318.

Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Gatewood SJ, Njoku DB, Rose NR. (2004) Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol*, 165 (6): 1883-94.

Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J, Poller W. (1999) Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther*, 6 (9): 1520-35.

Fok PT, Huang KC, Holland PC, Nalbantoglu J. (2007) The coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration. *J Biol Chem*, 282 (10): 7512-21.

Frustaci A, Bellocchi F, Osen EG. (1994) Results of biventricular endomyocardial biopsy in survivors of cardiac arrest with apparently normal hearts. *Am J Cardiol*, 74: 890-5.

Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. (2003) Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virologic and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation*, 107: 857-63.

Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, Deguchi H, Kawamura K, Isomura T, Suma H, Shimizu A. (2000) Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 36: 1920-6.

Fukae S, Ashizawa N, Morikawa S, Yano K. (2000) A fatal case of fulminant myocarditis with human herpesvirus-6 infection. *Intern Med*, 39 (8): 632-6.

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. (2003) CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*, 9: 1408-12.

Gamarnik AV, Andino R. (1998) Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*, 12 (15): 2293-304.

Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. (2002) Prevalence and quantification of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol*, 76: 1608-16.

Gatmaitan BG, Chason JL, Lerner AM. (1970) Augmentation of the virulence of murine coxsackievirus B-3 myocardiopathy by exercise. *J Exp Med*, 131: 1121-36.

Gomez RM, Lascano EF, Berria MI. (1991) Murine acinar pancreatitis preceding necrotizing myocarditis after Coxsackievirus B3 inoculation. *J Med Virol*, 35: 71-5.

Gooding LR, Elmore LW, Tollefson AE, Brady HA, Wold WS. (1988) A 14700 MW protein from the E3 region of adenoviruses inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell*, 53: 341-6.

Grasso M, Arbustini E, Silini E, Diegoli M, Percivalle E, Ratti G, Bramerio M, Gavazzi A, Vigano M, Milanesi G. (1992) Search for coxsackievirus B3 RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Am J Cardiol*, 69: 658-64.

Griffin LD, Kearney D, Ni J, Jaffe R, Fricker FJ, Webber S, Demmler G, Gelb BD, Towbin JA. (1995) Analysis of formalin-fixed and frozen myocardial autopsy samples for viral genome in childhood myocarditis and dilated cardiomyopathy with endocardial fibroelastosis using PCR. *Cardiovasc Path*, 4 (1): 3-11.

Grivel JC, Santoro F, Chen S, Faga G, Malnati MS, Ito Y, Margolis L, Lusso P. (2003) Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol*, 77: 8280-9.

Grodums EI, Dempster G. (1959) The age factor in experimental myocarditis in experimental coxsackie B-3 infection. *Can J Microbiol*, 5: 595-604.

Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, Vonhof S, Hein WJ, Muller G, Figulla HR. (1999) Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol*, 54 (2): 83-8.

Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. (1989) Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc*, 64 (10): 1235-45.

Hayder H, Müllbacher A. (1996) Molecular basis of immune evasion strategies by adenoviruses. *Immunol Cell Biol*, 74: 504-12.

Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton L. (1995) The role of CD8⁺ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol*, 69: 6720-8.

Henson D, Mufson MA. (1971) Myocarditis and pneumonitis with type 21 adenovirus infection. Association with fatal myocarditis and pneumonitis. *Am J Dis Child*, 121: 334-6.

Heymans S. (2006) Inflammation and cardiac remodeling during viral myocarditis. *Ernst Schering Res Found*, (55): 197-218. Workshop

Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, Vanhoutte D, Gao F, Torpai R, Baker AH, Padalko E, Neyts J, Schultheiss HP, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM. (2006) Inhibition of urokinase-type plasminogen

activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. *Circulation*, 114 (6): 565-73.

Heymans S. (2007) Myocarditis and heart failure: need for better diagnostic, predictive, and therapeutic tools. *Eur Heart J*, 28: 1279-80.

Horváth R, Cerny J, Benedík J Jr, Hökl J, Jelínková I, Benedík J. (2000) The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origing of atherosclerosis. *J Clin Virol*, 16 (1): 17-24.

Hotta Y, Masuko M, Hanyu T, Abe TK, Honda T, Tominaga K, Odani S, Kuwano R. (1998) Immunohistochemical analysis of new adhesion molecule gmp46. *Neurosci Res*, 22 (suppl): S313

Huhn GD, Gross C, Schnurr D, Preas C, Yagi S, Reagan S, Paddock C, Passaro D, Dworkin MS. (2005) MC outbreak among adults in Illinois 2003. *Emerg Infect Dis*, 11: 1621-24.

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldmanmd AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW. (2001) ACC/AHA Guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult executive summary. A report of the ACC/AHA task force on practice guidelines. *Circulation*, 104: 2996-3007.

Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Abe S, Shimojo T, Ito H, Ozasa S, Yamakawa K, Matsuzaki M, Mohammed MU, Nakazawa H, Kasajima T, Marumo F. (1997) Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*, 95: 489-96.

Ismail A, Khosravi H, Olson H. (1999) The role of infection in atherosclerosis and coronary artery disease: a new therapeutic target. *Heart Dis*, 1 (4): 233-40.

Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hotta Y, Honda T, Kuwano R, Aizawa Y. (2000) Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res*, 86 (3): 275-80.

James L, Vernon MO, Jones RC, Stewart A, Lu X, Zollar LM, Chudoba M, Westercamp M, Alcasid G, Duffee-Kerr L, Wood L, Boonlayangoor S, Bethel C, Ritger K, Conover C, Erdman DD, Gerber SI. (2007) Outbreak of human adenovirus type 3 infection in a pediatric long-term care facility--Illinois, 2005. *Clin Infect Dis*, 45 (4): 416-20.

Janaswami PM, Kalvakolanu DVR, Zhang Y, Sen GC. (1992) Transcriptional repression of interleukin-6 gene by adenoviral E1A proteins. *J Biol Chem*, 267: 886-91.

Kallwellis-Opara A, Dörner A, Poller WC, Noutsias M, Kühl U, Schultheiss HP, Pauschinger M. (2007) Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol*, 96: 469-80.

Kandolf R. The impact of recombinant DNA technology on the study of enteroviral heart disease. In: Bendinelli M and Friedmann H (szerk.) *Coxsackieviruses—a general update*. Plenum Publishing Corp. New York, New York, 1988: 293–318.

Kearney MT, Cotton JM, Richardson PJ, Shah AM. (2001) Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management. *Postgrad Med J*, 77 (903): 4-10.

Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, Tomioka M, Kawai C. (1985) Immunological behaviour of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation*, 71: 1247-54.

Krueger GR, Ablashi DV. (2003) Human Herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. *Intervirology*, 46 (5): 257-69.

Kueth F, Sigusch HH, Hilbig K, Tresselt C, Glück B, Egerer R, Figulla HR. (2007) Detection of viral genome in the myocardium: Lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated CM. *Am Heart J*, 153 (5): 850-8.

Kutaura Y. (1981) Experimental coxsackie B virus myocarditis in mice: 18 month histopathological and virological study. *Jpn Circ J*, 45: 747-62.

Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. (2003) Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*, 107 (22): 2793-8.

Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. (2003) Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation*, 108 (8): 945-50.

Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. (2005) High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*, 111 (7): 887-93.

Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. (2005) Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation*, 112 (13): 1965-70.

Lawson CM. (2000) Evidence for mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myocarditis. *Cell Mol Life Sci*, 57: 552-60.

Leonard EG. (2004) Viral myocarditis. *Pediatr Infect Dis J*, 23 (7): 665-6.

Liao L, Sindhwani R, Rojkind M, Factor S, Leinwand L, Diamond B. (1995) Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity. *J Exp Med*, 181: 1123-31.

Liu PP, Yan AT. (2005) Cardiovascular magnetic resonance for the diagnosis of acute myocarditis: prospects for detecting myocardial inflammation. *J Am Coll Cardiol*, 45: 1823-5.

Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, Huber SA. (1987) Coxsackievirus B-3 myocarditis: acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenetic mechanisms. *Am J Pathol*, 128: 455-63.

Lozinski GM, Davis GG, Krous HF, Billman GF, Shimizu H, Burns JC. (1994) Adenovirus myocarditis: retrospective diagnosis by gene amplification from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol*, 25 (8): 831-4.

Lucas A, Kremer EJ, Hemmi S, Luis J, Vignon F, Lazennec G. (2003) Comparative transductions of breast cancer cells by three DNA viruses. *Biochem Biophys Res Commun*, 309 (4): 1011-6.

Maekawa Y, Ouzounian M, Opavsky MA, Liu PP. (2007) Connecting the missing link between dilated cardiomyopathy and viral myocarditis: virus, cytoskeleton, and innate immunity. *Circulation*, 115 (1): 5-8.

Mahon NG, Zal B, Arno G, Risley P, Pinto-Basto J, McKenna WJ, Davies MJ, Baboonian C. (2001) Absence of viral nucleic acids in early and late dilated cardiomyopathy. *Heart*, 86 (6): 687-92.

Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. (2006) Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation*, 114 (15): 1581-90.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. (2006) Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation*, 113: 1807-16.

Martin AB, Webber S, Fricker FJ, Jaffe R, Demmler G, Kearney D, Zhang YH, Bodurtha J, Gelb B, Ni J. (1994) Congenital cardiovascular disease/diabetes: acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation*, 90 (1): 330-9.

Martino TA, Liu P and Sole MJ. (1994) Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 74 (2): 182-8.

Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE. (1995) A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med*, 333: 269-75.

Matsumori A. (1997) Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy: role of viruses, cytokines and nitric oxide. *Jpn Circ J*, 61: 275-91.

McCarthy RE, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Hare JM, Baughman KL. (2000) Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med*, 342: 690-5.

McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. (1993) Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*, 68: 159-69.

Mitchell LS, Taylor B, Reimels W, Barrett FF, Devincenzo JP. (2000) Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J*, 19 (10): 996-1000.

Morita H. (1981) Experimental coxsackie B-3 virus myocarditis in golden hamsters. Light and electron microscopy findings in a long-term follow-up study. *Jpn Circ J*, 45: 713-29.

Muir P, Nicholson F, Illavia SJ, McNeil TS, Ajetunmobi JF, Dunn H, Starkey WG, Reetoo KN, Cary NR, Parameshwar J, Banatvala JE. (1996) Serological and molecular evidence of enterovirus infection in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Heart*, 76 (3): 243-9.

Ni J, Bowles NE, Kim YH, Demmler G, Kearney D, Bricker JT, Towbin JA. (1997) Viral infection of the myocardium in endocardial fibroelastosis. Molecular evidence for the role of mumps virus as an etiologic agent. *Circulation*, 95: 133-9.

Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. (2001) Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation*, 104 (3): 275-80.

Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss H, Kühl U. (2002) Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy – diagnostic significance of T-lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit*, 8: 478-87.

Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T. (2003) Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med*, 9: 1477-83.

Oldroyd SD, Thomas GL, Gabbiani G, El Nahas AM. (1999) Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int*, 56: 2116-27.

Pankuweit S, Portig I, Lottspeich F, Maisch B. (1997) Autoantibodies in sera of patients with myocarditis: characterization of the corresponding proteins by isoelectric focusing and N-terminal sequence analysis. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 77-84.

Parrillo JE, Cunnion RE, Epstein SE, Parker MM, Suffredini AF, Brenner M, Schaer GL, Palmeri ST, Cannon RO, Alling D, Wittes JT, Ferrans VJ, Rodriguez ER, Fauci AS. (1989) A prospective, randomized, controlled trial of prednisone for dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 321: 1061-8.

Pauschinger M, Phan MD, Doerner A, Kuehl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. (1999) Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation*, 99 (7): 889-95.

Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes Garcia FJ, Pham V, Kühl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA. (1999) Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*, 99 (10): 1348-54.

Pauschinger M, Chandrasekharan K, Schultheiss HP. (2004) Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system. *Heart Fail Rev*, 9: 21-31.

Petitjean J, Kopecka H, Freymuth F, Langlard JM, Scanu P, GAlateau F, Bouhour JB, Ferrière M, Charbonneau P, Komajda M. (1992) Detection of enteroviruses in endomyocardial biopsy by molecular approach. *J Med Virol*, 37 (1): 76-82.

Philipson L, Pettersson RF. (2004) The CAR a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Immunol*, 273: 87-111.

Poller W, Fechner H, Noutsias M, Tschoepe C, Schultheiss HP. (2002) Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system. Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy. *Z Kardiol*, 91 (12): 978-91.

Prezioso PJ, Cangiarella J, Lee M, Nuovo GJ, Borkowsky W, Orlow SJ, Greco MA. (1992) Fatal disseminated infection with human herpesvirus-6. *J Pediatr*, 120: 921-3.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsfas I, Martin I, Nordet P. (1996) Report of the 1995 WHO/ISCF task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93: 841-2.

Roivainen M, Alfthan G, Jousilahti P, Kimpimäki M, Hovi T, Tuomilehto J. (1998) Enterovirus infections as a possible risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, 98 (23): 2534-7.

Ross RS and Chien KR. (1989) Of molecules and myocardium. PCR diagnosis of viral myocarditis in cardiac biopsies. *Circulation*, 82: 294-5.

Rueckert RR Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN et al (ed.) *Virology*, third edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996: 609-54.

Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. (1999) CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell*, 99: 817-27.

Sasse A, Wallich M, Ding Z, Goedecke A, Schrader J. (2003) Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure. *J Gene Med*, 5 (10): 876-82.

Savon C, Acosta B, Valdes O, Goyenechea A, Gonzalez G, Pinon A, Mas P, Rosario D, Capo V, Kouri V, Martinez PA, Marchena JJ, Gonzalez G, Rodriguez H, Guzman MG.

(2008) A myocarditis outbreak with fatal cases associated with adenovirus subgenera C among children from Havana City in 2005. *J Clin Virol*, 43 (2): 152-7.

Selinka HC, Wolde A, Sauter M, Kandolf R, Klingel K. (2004) Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med Microbiol Immunol*, 193 (2-3): 127-31.

Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, Ferrans VJ, Fenoglio JJ, Edwards WD, Tsai CC, Saffitz JE, Isner J, Furner S. (1987) Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation*, 75: 401-5.

Shimizu C, Rambaud C, Cheron G, Rouzioux C, Lozinski GM, Rao A, Stanway G, Krous HF, Burns JC. (1995) Molecular identification of viruses in sudden infant death associated with myocarditis and pericarditis. *Pediatr Infect Dis J*, 14: 584-8.

Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. (2001) Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation*, 104: 826-31.

Smith CA, Woodruff LS, Kitchingman GR. (1998) Extensive cross-reactivity of Adenovirus-specific cytotoxic cells. *Hum Gene Ther*, 9: 1419-27.

Sohal RS, Burch GE, Chu KC, Leiderman E, Colcolough HL. (1968) Ultrastructural changes in cardiac capillaries of Coxsackie virus B4 infected mice. *Lab Invest*, 19: 399-405.

Spiller OB, Goodfellow IG, Evans DJ, Allmond JW, Morgan BP. (2000) Echoviruses and coxsackie B viruses that use human decay-accelerating factor (DAF) as a receptor do not bind the rodent analogues of DAF. *J Infect Dis*, 181: 340-3.

Steil BP, Barton DJ. (2008) Poliovirus cis-acting replication element-dependent VPg Uridylylation lowers the Km of the initiating nucleoside triphosphate for viral RNA replication. *J Virol*, 82 (19): 9400-8.

Stille Siegener M, Heim A, Figulla HR. (1995) Subclassification of dilated cardiomyopathy and interferon treatment. *Eur Heart J*, 16 (suppl O): 147-9.

Sugrue DD, Roedeheffer RJ, Codd MB, Ballard DJ, Fuster V, Gersh BJ. (1992) The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study. *Ann Intern Med*, 117: 117-23.

Tam PE. (2006) Coxsackievirus Myocarditis: Interplay between virus and host in the pathogenesis of heart disease. *Viral Immunology*, 19 (2): 133-46.

Tomko RP, Xu R, Philpottson L. (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (7): 3352-6.

Towbin JA, Griffin LD, Martin AB, Nelson S, Siu B, Ayres NA, Demmler G, Moise KJ Jr, Zhang YH. (1994) Intrauterine adenoviral myocarditis presenting as nonimmune hydrops fetalis: diagnosis by PCR. *J Pediatr Infect Dis*, 13 (2): 144-50.

Towbin JA. (1998) The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 131-9.

Tracy S, Wiegand V, McManus B, Gauntt C, Pallansch M, Beck M, Chapman N. (1990) Molecular approaches to enteroviral diagnosis in idiopathic cardiomyopathy and myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, 15: 1688-94.

Tuve S, Wang H, Ware C, Liu Y, Gaggar A, Bernt K, Shayakhmetov D, Li Z, Strauss R, Stone D, Lieber A. (2006) A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol*, 80 (24): 12109-20.

Tuve S, Wang H, Jacobs JD, Yumul RC, Smith DF, Lieber A. (2008) Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35. *PLOS Pathog*, 4 (10): e1000189.

Van Creveld S, DeJager H. (1956) Myocarditis in new-borns caused by Coxsackie virus. Clinical and pathological data. *Am Pediatr*, 187: 100-12.

Van den Veyver IB, Ni J, Bowles N, Carpenter RJ Jr, Weiner CP, Yankowitz J, Moise KJ Jr, Henderson J, Towbin JA. (1998) Detection of intrauterine viral infection using the PCR. *Mol Genet Metab*, 63 (2): 85-95.

Wadell G. (1984) Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 110: 191-220.

Wang K, Asinger RW, Marriott HJ. (2003) ST segment elevation in conditions other than acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 349 (22): 2128-35.

Wang X, Bergelson JM. (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol*, 73: 2559-62.

Weiss LM, Liu XF, Chang KL, Billingham ME. (1992) Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissues. *J Clin Invest*, 90 (1): 156–9.

Wessely R, Klingel K, Santana LF. (1998) Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 102: 1444-53.

White E. (1993) Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. *Proc Soc Exp Biol Med*, 204: 30-9.

Why HJF, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC. (1994) Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 89: 2582-9.

Woodruff JF. (1980) Viral myocarditis: a review. *Am J Pathol*, 101: 425-83.

Yuen S, Smith J, Caruso L, Balan M, Opavsky MA. (2011) The coxsackie-adenovirus receptor induces an inflammatory cardiomyopathy independent of viral infection. *J Mol Cell Cardiol*, doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.011.

Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Kito H, Iwasaki T, Kurata T, Tanaka T, Saito Y, Asano Y. (2001) Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. *J Clin Pathol*, 54 (10): 792-5.

Zautner AE, Korner U, Henke A, Badorff C, Schmidtke M. (2003) Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *J Virol*, 77: 10071-7.

9. Az értekezés témájával összefüggő saját eredeti közlemények

1. Tátrai E, Bedi K, Kovalszky I, Ifj Hartyánszky I, Lászik A, Acsády Gy, Sótonyi P, Hubay M. (2011) No mutation but high mRNA expression of Coxsackie-Adenovirus Receptor was observed in both dilated and ischemic cardiomyopathy. Forensic Sci Int, doi: 10.1016/j.forsciint.2011.05.010.

IF: 2,104

2. Tátrai E, Ifj Hartyánszky I, Lászik A, Acsády Gy, Sótonyi P, Hubay M. (2011) The role of viral infections in the development of dilated cardiomyopathy. Pathol Oncol Res, 17 (2): 229-35.

IF: 1,152

3. Tátrai E, Ifj Hartyánszky I, Lászik A, Hubay M, Acsády Gy, Sótonyi P. (2007) Víruskimutatás molekuláris biológiai vizsgálattal cardiomyopathiás betegek szívizommintáiból. Orv Hetil, 148 (48): 2275-8.

10. További közlemények

1. Ifj Hartyánszky I, Tátrai E, Lászik A, Hubay M, Szelíd Zs, Acsády Gy, Szabolcs Z, Merkely B, Horkay F, Sótonyi P. (2011) Patchy myocardial pattern of virus sequence persistence in heart transplant recipients – possible role of sampling error in the etiology. Transplant Proc, 43 (4): 1285-9.

IF: 0,994

2. Sótonyi P, Tátrai E. (2009) Electron microscopic demonstration of Romhányi's aldehyde-bisulphite-toluidine blue (ABT)-topo-optical staining reaction. Acta Histochem, 111 (4): 326-8.

IF: 1,234

3. Kovalszky I, Dudás J, Gallai M, Hollósi P, Tátrai P, Tátrai E, Schaff Z. (2004) Proteoglikánok a májban. Magy Onkol, 48 (3): 207-13.

11. Köszönetnyilvánítás

Legelső helyen szeretném megköszönni Prof. Dr. Sótonyi Péternek és szakdolgozatom témavezetőjének, Prof. Dr. Kovalszky Ilonának, hogy PhD munkámat elkezdhettem, továbbá hálás köszönettel tartozom a munkám során kapott értékes javaslataikért, emberi és szakmai támogatásukért, melyek nélkül nem készülhetett volna el ez a munka.

Köszönöm Dr. Tőkés Anna-Máriának az értekezésem alapos áttanulmányozását és hasznos észrevételeit, melyekkel nagymértékben hozzájárult a dolgozat tartalmának és külsejének javításához.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Keller Évának, hogy a PhD munkámhoz helyet biztosított az intézetben.

Köszönöm Dr. Lászik Andrásnak, hogy helyet biztosított laboratóriumában és munkám során hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom Dr. Hubay Mártának, aki gondos és precíz tanácsaival, szöveztani vizsgálataival és gyakorlatias látásmódjával jelentős mértékben segítette munkámat. Építő kritikával időt és fáradságot nem sajnálva segítette munkám haladását.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Acsády Györgynek a maximális támogatásért és a kapcsolattartás biztosításáért, továbbá Dr. Hartyánszky Istvánnak és kedves kollégáinak, akik lelkiismeretes gondossággal és precizitással biztosították és továbbították a vizsgálatokhoz szükséges humán szövetmintákat intézetünk számára.

A dolgozatban leírt kísérletekhez rengeteg gyakorlati segítséget kaptam Bedi Katalintól, Dr. Tátrai Pétertől, Dr. Baghy Kornéliától, Deák Erzsébettől, Vassné Tóth Ágnestől és Seffer Istvánnétól. A felsoroltakon kívül köszönet illeti az egész Igazságügyi Biztosítás-orvostani Intézet munkatársait, hogy baráti légkört biztosítottak és feladataim megoldásában mindig segítségemre voltak.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom a Freiburgi Igazságügyi Orvostani Intézetnek, elsőként Herr Professor Stefan Pollaknak, az Intézet igazgatójának, továbbá Sabine Lutz Bonengelnek, Maria Heinrichnek és Antje Koppelkammnak a szakmai és baráti légkörért, mellyel az ottléteim során körbevettek.

Végül pedig köszönettel tartozom szüleimnek, testvéremnek, férjemnek és kisfiamnak, hogy családi, szerető otthont biztosítottak és végig bátorítottak, mely nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.