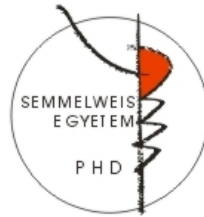


# **Víruskimutatás, és a Coxsackie- Adenovírus Receptor expressziós vizsgálata szívtranszplantáción átesett kardiomiopátiás betegek szívizomzatából**

Doktori (Ph.D.) tézisek

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

## **BEVEZETÉS I.**

A molekuláris technikáknak köszönhetően napjainkra már több vírus típust detektáltak szívizomzatban, melyeknek kóroki szerepet tulajdonítanak miokarditisz (MC) és feltehetően annak egy késői következményének tekintett dilatatív kardiomiopátia (CM) kialakulásában.

A Coxsackie 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 beteg szívizomban.

A kardiotrop vírusok 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. Az MC az esetek egy részében felderítetlen marad, míg másik részében influenzaszerű tüneteket idéz elő felső légúti vagy gyomor-bélrendszeri panaszok formájában. 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.

Akut MC gyanúja esetében gyakori eset, hogy az elektrokardiogram (EKG) abnormális képet mutat, érzékenysége közel 47 %-os, azonban specifitása ismeretlen.

A vírus szerológia napjainkra már elavult technikának tekinthető, köszönhetően az alacsony érzékenységének és specifitásának, továbbá a szív vírusfertőzöttségének a tényét sem igazolta a vizsgálat.

A klinikus az endomiokardiális biopszián (EMB) elvégzett szövettani vizsgálat eredménye alapján hozhat döntést a megfelelő terápia kiválasztásában. Indokoltnak tekinthető az a szemlélet, miszerint a klinikusok MC gyanúja esetében maximum 2 napot várnak az EMB elvégzését megelőzően. 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 beteg esetében elvégzendő az EMB. Ennek háttérében az áll, 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.

Az MC-ben szenvedő betegek esetében elvégzett szövettani vizsgálatok kiértékelése a Dallas-kritériumok alapján történik, mely számos buktatóval rendelkezik:

- eltérő patológiai értelmezést eredményezhet;
- a mintavételezési hiba kiküszöbölése körülményes;
- figyelmen kívül hagyja a patológiai eltérés okát.

A diagnózis felállításában meghatározó a gyulladással infiltrátumok megléte, melyben előfordul nekrózis is. Szívizomsejt-nekrózis hiánya szórványos gyulladással infiltrátum meglétével együtt határesetet jelent az MC diagnosztizálásában. A mintavételezési hely a jelenlegi gyakorlat szerint a jobb kamra szeptális területe.

A legújabb vizsgálatok eredményei alapján igen eltérő arányban találtak MC-s és dilatatív CM-es szívizomban vírus szekvenciákat. 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.

A 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 leggyakoribb tünet a gyengeség és a fáradtság, továbbá a csökkent szívteljesítmény.

## **BEVEZETÉS II.**

A Coxsackie-Adenovírus Receptor (CAR), mint sejtfelszíni fehérje az entervírusok (EV-k) és AdV-k jelentős hányada számára teszi lehetővé a gazdasejtbe jutást vírusinfekció során. A CAR egy 46 kDa protein, mely a CTX (*Cortical thymocyte marker in Xenopus*) fehérjék csoportjába tartozik és két extracelluláris immunglobulin domént hordoz. A CAR fehérje epitél sejtek szoros illeszkedési (*tight junction*) pontjain fejeződik ki, azonban fiziológiai szerepe nagyrészt ismeretlen.

Az elmúlt években derült fény arra, hogy egerekben a CAR elsősorban embrionális korban expresszálódik az agyban és a szívben igen nagy mennyiségben, ami azt sugallja, hogy jelentős szereppel bír az említett szervek embrionális fejlődésében a sejtek közötti kommunikáció fenntartása révén. Ezzel szemben felnőtt egerek idegrendszerében alacsony mértékben expresszálódott, vagy egyszerűen hiányzott a CAR fehérje, hasonlóan a szívizomhoz.

Azokban az egérembriókban, ahol a CAR gén célzott deléciójával inaktívvá tették a fehérjét, az embrionális fejlődés során a 11. nap környékén a mutáns egerek 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 időszakban, már két atrioventrikuláris csatorna volt jelen, mely egyértelműen a szív fejlődésének elmaradását támasztotta alá. Emellett megfigyelték, hogy normál sejtekben általában 12-15 szarkomer kapcsolódik egymáshoz hosszanti irányban, míg a mutáns sejtekben csak 4-6 szarkomer. A CAR célzott deléción az embrionális fejlődés során a miofibrillumok rendezetlenné válása mellett megnövekedett szívizomsejt proliferációt és apoptózist idézett elő.

## 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. Tekinthető-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 szív mintákhoz képest és igazolható-e immunfluoreszcens vizsgálattal az mRNS szintű eredményünk?



## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

- 2005. november és 2008. március között folyamatos mintagyűjtés során 35 szívátültetésre került CM-es beteg (16 dilatatív, 17 iszkémiás és 2 inflammatórikus CM) szívizommintája és vérmintája került vizsgálatra.
- DNS és RNS izolálás szívizom- és vérmintából.
- Enterovírus, Adenovírus 2-es és 3-as típus, Humán Herpesz Vírus 6 sokszorosítása nested-PCR-rel, majd a PCR termékek agaróz gélen futtatása.
- Vírus-pozitív minták direkt szekvenálása kapilláris gélelektroforetikus készüléken.
- A szívizomminták hisztológiai vizsgálata.
- CAR mRNS expressziós vizsgálata valós-idejű PCR alkalmazásával.
- CAR fehérje immunfluoreszcens vizsgálata.
- CAR exonok szekvencia-meghatározása.

## **EREDMÉNYEK**

### **1. Víruskimutatás PCR-rel**

Az AdV3 szekvenciát a betegek 20%-ában tudtunk kimutatni. Az AdV3-ra 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 inflammatórikus CM-ben szenvedett. Az inflammatórikus CM-ben szenvedett fiatal nő szívének jobb kamra elülső falában JKEF és bal kamra hátsó falában (BKHF) kimutatott AdV3 mellett HHV6 szekvenciát is találtunk a bal kamra apikális régiójában (BKAR). EV és AdV2 szekvenciát azonban egyik minta esetében sem tudtunk kimutatni. A vérminták és a kontroll minták tekintetében szintén negatív eredmény született a vizsgált vírusokra.

### **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.

### **3. Hisztológiai eredmények**

Az iszkémiás szívizomzatban inflammatórikus infiltrátumokat nem detektáltunk. A dilatatív CM-es betegek makroszkópos szempontból a betegség klasszikus képét mutatták. Krónikus, főleg mononukleáris gyulladással jellemezhető infiltrációt csak egy esetben találtunk az endokardium különleges megvastagodásával (laza kötőszövet felszaporodása, hajszálerekben gazdag, idült mononukleáris lósejtekkel átjárt granulációs szövet).

### **4. CAR mRNS expressziós vizsgálata**

A mRNS szintű vizsgálat 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. Szignifikáns különbség mutatkozott mind a dilatatív (8,16-szoros,  $p < 0,0002$ ), mind az iszkémiás (4,33-szoros  $p < 0,002$ ) CM-es szívizomminták tekintetében a kontroll csoporthoz viszonyítva. A két inflammatórikus CM esetben 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  $p=0,39$ ). A kapott eltérő expressziós mintázat nem mutatott összefüggést sem a korrall, sem a nemmel.

## **5. CAR immunfluoreszcens vizsgálata**

A CAR mRNS szintű vizsgálata során kapott eredményünkent kívántuk alátámasztani az elvégzett immunfluoreszcens vizsgálattal. Mindhárom betegcsoporttól származó szívizommintákban sikerült magasabb CAR expressziót demonstrálni a kontroll mintákhoz képest. Dilatatív CM esetében az Eberth-vonalakban (ICD) és a szarkolemmában adott erősebb reakciót, míg a kontroll szívizommintákban az ICD régió egyáltalán nem, vagy csak csekély mértékben adódott CAR-pozitívnak. Iszkémiás CM-es szívizommintákban is hasonlóan a dilatatív CM-es mintákhoz, az ICD régiókban és a szarkolemmában volt pozitív reakció. Ugyanakkor az inflammatórikus CM esetében szintén a dilatatív CM-hez hasonló kép mutatkozott talán erősebb membrán pozitivitással annak ellenére, hogy az mRNS szintű

vizsgálat nem mutatott szignifikáns különbséget az egészséges kontroll mintákhoz képest.

## **6. CAR exonok szekvenálása**

A CAR gén 7 exonjának szekvencia meghatározása során nem találtunk semminemű eltérést az adatbázisban található exon szekvenciákhoz képest, mely esetlegesen befolyásolhatná a dilatatív, az iszkémiás vagy az inflammatórikus CM patogenezt.

## **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 kontrollesoportnak ezekben a vizsgálatokban.
4. A vírus-pozitív eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a jobb kamra szeptális régiójából származó EMB eredménye alapján nagy eséllyel igazolható vírus jelenléte.
5. A szövettani vizsgálati eredménnyel megerősítettük azt a korábbi megfigyelést, miszerint az EMB-ből történő szövettani vizsgálat érzékenysége alacsony.

6. Magasabb CAR expressziót detektáltunk mindhárom betegcsoportban mRNS szinten, 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 feltehetően a CAR a sejt-sejt közötti kapcsolat fenntartásában, és a szöveti regenerálódásban bírhat szereppel.

## **A SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE**

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

**IF: 2,104**

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



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelső helyen szeretném megköszönni Prof. Dr. Sótonyi Péter témavezetőmnek, hogy PhD munkámat elkezdhettem, továbbá köszönettel tartozom a munkám során kapott értékes javaslatáért, emberi és szakmai támogatásáért, melyek nélkül nem készülhetett volna el ez a munka.

Köszönöm Prof. Dr. Kovalszky Ilonának, hogy PhD munkámat elkezdhettem, továbbá, hogy az I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben lehetőséget biztosított a vizsgálataim elvégzéséhez.

Köszönöm Dr. Tőkés Anna-Máriának az értekezésem alapos áttanulmányozását és hasznos észrevételeit, melyekkel nagyban hozzájárult a dolgozat mind tartalmának, mind pedig 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, szövettani 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 Ifj. 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 Ilonától. 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 Professor Stefan Pollaknak, az Intézet igazgatójának, továbbá Sabine Lutz Bonengelnek, Maria Heinrichnek és Antje Koppelkamnnak a baráti és szakmai légkörért, mellyel az otléteim során körbevettek.

Végül pedig köszönettel tartozom szüleimnek, testvéremnek, férjemnek és kisfiamnak, hogy családias, szerető otthont

biztosítottak és végig bátorítottak, mely nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.