

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HERPESVÍRUSOK ELŐFORDULÁSA ÉS AKTIVITÁSA
APIKÁLIS PERIODONTITISZBEN**

DR. HERNÁDI KATINKA

Témavezető: Dr. Kónya József



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2011

HERPESVÍRUSOK ELŐFORDULÁSA ÉS AKTIVITÁSA APIKÁLIS PERIODONTITISZBEN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta:

Dr. Hernádi Katinka
fogszakorvos

Készült a

Debreceni Egyetem

Gyógyszerészeti Tudományok
doktori iskolája

Mikrobiológia és Farmakológia
programja keretében

Témavezető: Dr. Kónya József

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Deák Judit, Ph.D.
Dr. Dezső Balázs, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

2011. 10. 11. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Minárovits János, MTA doktora
Prof. Dr. Sipka Sándor, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Deák Judit, Ph.D.
Dr. Dezső Balázs, Ph.D.
Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora
Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja és helyszíne:

2011. 10. 11. 13:00

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

Számos szájüregi kórfolyamat kialakulásában felmerült a herpesvírusok patogén szerepe, például irreverzibilis pulpitisz, apikális és marginális periodontitisz, illetve egyes nyálkahártyagyulladások esetén. Az apikális periodontitist, amely a foggyökér apikális régiójának gyulladása, kevert mikrobiális flóra jellemzi, opportunista Gram-negatív baktériumok dominanciájával. A bakteriális flóra mellett azonban felmerült egyes humán herpesvírusok kóroki jelentősége is, mint például az Epstein-Barr vírus (EBV) és a humán cytomegalovírus (HCMV).

A humán herpesvírusok rendkívül gyakoriak világszerte, a felnőtt lakosság több mint 90%-a EBV-fertőzött és több mint 50%-a HCMV-szeropozitív. A HHV-6 szintén gyakori Európában, illetve az Egyesült Államokban: a gyermek és felnőtt lakosság körében 75% és 95% közötti szeropozitivitás mutatható ki. A herpesvírusok egyik meghatározó sajátossága, hogy a primer fertőzést követően képesek éveken keresztül látenszen perzisztálni a gazdaszervezetben. Az EBV kezdetben oronasopharyngeális epiteliális sejteket fertőz lítikus formában, majd a vírus elsődlegesen B-limfocitákat fertőz, melyekben I. típusú látencia-állapotban van jelen. Ez a látencia-állapot nem változtatja meg a gazdasejt funkcióit és az EBV nukleáris antigén-1 (EBNA-1) az egyetlen virális antigén, amely kifejeződik.

A HHV-6 vírusnak két altípusa különíthető el, az A (HHV-6A) és a B (HHV-6B) altípusok. Mindkét altípus számára az elsődleges célsejteket a CD4+ T limfociták képezik, de a HHV-6A CD8+ T sejtekben és NK sejtekben is képes replikálódni. A virális látencia számára ideális helyszínt szolgáltatnak a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek és a csontvelői őssejtek (CD34+) mindkét altípus esetében.

Az egészséges hordozókban a HCMV-látencia elsődleges helyszínét a perifériás vér monocitái képezik. További látencia-helyek lehetnek a csontvelői CD34+ myeloid progenitor őssejtek, a dendritikus sejt (DC) prekursorok, továbbá a nyálmirigyek és a vese epiteliális sejtjei.

A primer fertőzést követően a herpesvírusok látenszen perzisztálnak a gazdaszervezetben és időnként, akár spontán módon is reaktiválódnak. A herpesvírus-reaktiváció során fokozódik a virális antigének termelődése, amelyeket azonnal felismer a sejtes immunitás az immunkompetens egyénekben. A sejtes immunvédekezést ugyanakkor számos általános, illetve helyi tényező gyengítheti. Az általános tényezők között említendő a lázas állapot, a szöveti sérülések, a stressz, egyes fertőzések és bizonyos gyógyszerhatások. Az anatómiai elhelyezkedés is segítheti helyileg a vírusok rejtőzködését az immunrendszer elől, valamint a fertőzési góccokban lévő mikrobiális koinfekciók is befolyásolhatják helyileg a szervezeti válaszreakciókat.

Az apikális periodontitisz többnyire panaszmentes, krónikus lefolyású gyulladás, amelyben fájdalommal, ráharapási érzékenységgel és fokozott periapikális csontpusztulással kísért akut fellángolások is előfordulhatnak. Egy korábbi hipotézis alapján feltételezhető, hogy immunsejtek infiltrálódnak a gyulladt periapikális szövetek közé, melyek közül a mononukleáris sejtek látens herpesvírus-fertőzést hordozhatnak. A gyulladással szövetkörnyezet, illetve a lokális baktériumflóra együttesen elősegíthetik a vírusok reaktiválódását. A reaktiválódott vírusok számos citokin termelődését befolyásolják, például a tumor nekrozis factor- α (TNF- α), transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), interleukin (IL)-1 β , IL-8, IL-10, IL-15 termelődését, amelyek jelentős immunszuppresszív hatást és immun-mediált szövetkárosodást okozhatnak. Mindezek elősegíthetik a helyi endopatógen bakteriális flóra virulenciájának felerősödését. Az endopatógen bakteriális flóra, a herpesvírusok és az immun-mediált szövetkárosodás együttes hatása elősegítheti az akut fellángolás létrejöttét a krónikus gyulladásban.

Az EBV-fertőzött B limfocitákban a vírus maradhat látens állapotban vagy lítikus reaktiváció következhet be, amely produktív vírustermeléssel és a gazdasejt lízisével jár együtt.

Mindemellett fontos megemlíteni, hogy az EBV egyedülálló sajátossága, hogy három különböző látencia- állapotban létezhet a gazdasejten belül, a sejt környezettől függően. Korábbi irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a periapikális gyulladásokban nem reaktiváció, hanem látenciaváltozás jön létre az EBV-fertőzött B limfocitákban, amelynek során III-as típusú látencia-állapotba lép át a gazdasejt. III-as típusú látencia-állapotban az összes nukleáris EBV antigén (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), illetve látens membránprotein kifejeződik és jelentős mértékben módosulnak a gazdasejt funkciói a citokin és kemokin profil megváltozásán keresztül. Az EBV-fertőzött B-limfociták III-as típusú látenciában számos gyulladással citokint termelnek, köztük kiemelendő a TNF- α , TGF- β és az IL-10. A TNF- α fokozza a csontfelszívódást és erőteljes hiperalgéziát képes indukálni. A TGF- β gyengíti az antivirális immunvédekezést a limfocita-proliferáció, citotoxikus T sejt funkciók, toll-like receptorok (TLR) szignalizációjának gátlásán keresztül, illetve makrofágok és dendritikus sejtek aktiválásának gátlásával. Az IL-10 is gátolja a makrofágok aktiválódását, valamint a makrofágok és dendritikus sejtek antigén prezentációját.

A HHV-6 képes lecsökkenteni az IL-12 termelést, amely a Th1 polarizált antivirális immunválasz egyik kulcsmolekulája. Korábbi kutatások arról is beszámolnak, hogy a HHV-6 infekció gátolja a gazdasejt IL-2 és γ -IFN termelését, ugyanakkor fokozza a TNF- α , IL-1 β , IL-8 és IL-15 citokinek produkcióját. Dendritikus sejtekben a vírusinfekció lecsökkenti az MHC I molekulák expresszióját és a sejtek T sejt proliferációt stimuláló hatását. A vírus downregulálja a

CD46 receptor expresszióját is, mely komplement-mediált sejt és szövetkárosodáshoz vezethet, miután a CD46 glikoproteinek elengedhetetlen szerepe van a sejteken a spontán komplement aktiváció meggátolásában.

A HCMV reaktiválódását megfigyelték a fertőzött monociták szöveti makrofágokká történő differenciálódásakor, illetve a fertőzött dendritikus sejtek érése során. Az így képződött új virionok további makrofágokat, T-limfocitákat, endoteliális és kötőszöveti sejteket fertőzhetnek. A citopátiás hatású HCMV a lítikus fertőzés során a makrofágok diszfunkcióját okozza. A vírus gátolja a fertőzött monociták kemokinekhez kötött migrációját és azon képességüket, hogy további immunsejteket vonzanak a gyulladás helyszínére. A fertőzött dendritikus sejteken és makrofágokon az MHC molekulák számának lecsökkentésével a HCMV rejtve maradhat immunfelügyelet sejtjei előtt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az EBV, HCMV és HHV-6 előfordulásának meghatározása a vírusok DNS-ének kimutatásával a periapikális léziókban és a kontroll mintákban.

2. Az EBV, HCMV és HHV-6 fertőzés aktivitásának kimutatása virális mRNS detektálása révén a periapikális léziókban és a kontroll mintákban.

3. Összefüggések keresése az EBV, HCMV és HHV-6 fertőzések előfordulása és aktivitása, valamint a páciensek anamnézise, illetve klinikai tünetei között.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Mintagyűjtés és a minták osztályozása

A kutatás során 40 apikális periodontitisz és 40 kontroll minta került feldolgozásra. A vizsgálatban résztvevő betegek a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Kar, Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Tanszékén részesültek ellátásban. A mintagyűjtés a Klinikai Etikai Bizottság jóváhagyásával történt (azonosítási szám: 2885-2008). A vizsgálatban résztvevő betegeket azonosítószámmal láttam el, ezáltal módot teremtve a betegadatokat anonim kezelésére. A mintagyűjtést megelőzően a résztvevő betegek mindegyike írásos tájékoztatót kapott a beavatkozás jellegéről, illetve a lehetséges kockázatokról és kellemetlenségekről, valamint a tájékoztatót követően műtéti beleegyező nyilatkozatot írt alá. A kóros mintákat szolgáltató betegekkel kérdőíveket töltöttem ki, melyek az általános betegségekről, rendszeresen szedett gyógyszerekről, illetve az érintett fog anamnézisééről tartalmaztak kérdéseket.

A periapikális léziókat szolgáltató betegcsoportnál fontos kritérium volt a kielégítő általános állapot súlyosabb szisztémás betegség nélkül (az Amerikai Aneszteziológiai Társaság ajánlása alapján), valamint szájsebészeti apikotómia szükségessége egy vagy több fogon a hagyományos gyökérkezeléses terápia sikertelensége miatt. A krónikus apikális periodontitisz diagnózisa az érintett fog anamnézise, illetve a klinikai és radiológiai vizsgálatok eredménye alapján került felállításra. A betegcsoporton kívül estek a rossz általános állapotú, illetve súlyos szisztémás betegségben szenvedő betegek, valamint a marginális periodontális gyulladásban érintett fogak (szondázási mélység > 4 mm).

Az apikális periodontitiszben szenvedő fogakat panaszos és panaszmentes csoportokba osztottam. A panaszos fogakra akut fájdalom, ráharapási és kopogtatási érzékenység, illetve a gyökércsúcsi régió nyálkahártya felőli nyomásérzékenysége volt jellemző. A panaszmentes fogak esetében jelentősebb panaszt, illetve klinikai tünetet nem észleltem (a radiológiai kórjelektől eltekintve). A periapikális elváltozások további osztályozási szempontját képezte a lézió röntgenfelvételen látható nagysága, radiológiai átmérője. Ennek alapján elkülönítettem 5 mm-es vagy annál nagyobb periapikális léziókat (≥ 5 mm) és 5 mm-nél kisebb léziókat (< 5 mm).

Az apikális periodontitiszes minták a fogak gyökércsúcsának sebészi eltávolítása, rezekciója során gyűjtöttem. A kontrollként használt gyulladásmentes fogbéliszövetet impaktált bölcsességfogak sebészi eltávolítása során gyűjtöttem.

3.2. Nukleinsav izolálás és PCR reakciók

A homogenizált kóros és kontroll mintákat két részre osztottam: az egyik részt DNS-izoláláshoz, a másikat RNS-izoláláshoz használtam fel. A sejtek DNS tartalmának izolálásához virális nukleinsav izoláló kittet (High Pure Nucleic Acid Kit, Roche) használtam a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS tartalom kinyeréséhez TRI Reagenssel (Sigma) történt a gyártó utasításainak megfelelően. A reverz transzkripció PCR (RT-PCR) során az RNS minták komplementer DNS-sé (cDNS) történő átalakítását random hexamereket tartalmazó reverz transzkripció kittel (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) végeztem. A DNS-izolálás hatékonyságát egy folyamatosan expresszálandó „háztartási gén”, a humán beta-globin DNS PCR-rel történő azonosításával ellenőriztem. Az RNS-izolálás hatékonyságát ugyancsak egy folyamatosan expresszálandó „háztartási gén”, a h36B4 riboszómális foszfoprotein mRNS-ének - reverz transzkriptáz PCR-rel történő - azonosításával ellenőriztem. A vírus-detektálás érzékenységének növelése érdekében nested PCR amplifikációt alkalmaztam. Ennek első körében 5 mikroliter DNS, illetve cDNS templátot használtam, míg a második körben 3 mikroliter első körös PCR terméket mértem be templátként. A PCR végtérfogat 20 μ l volt, melyben 1 egység Red Taq Ready Mixet használtam fel (Sigma) a gyártó utasításainak megfelelően.

Az EBV mRNS és DNS azonosítására használt primerek az EBNA-2 és a *Bam*H1-W fragmentumokat amplifikálták az EBV genomból. A HHV-6 DNS amplifikálására használt primerek az IE fragmentre illeszkedtek, mely egy konzervatív szabályozó régió a HHV-6 genomban. A HCMV mRNS és DNS azonosítása során a primerek a pp65 génből amplifikáltak szekvenciákat, amely egy későn átíródó mátrix foszfoprotein. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel (1.5%-os töménységű gélen) tettem láthatóvá, mely 0.5 μ g/ml ethidium bromidot tartalmazott.

3.3. Statisztikai analízis

A kontroll- és a betegcsoportok közötti különbségek szignifikanciáját az esetek többségében Yates korrigált khi-négyzet statisztikai teszttel elemeztük. Amennyiben a 2x2-es kontingencia táblázat bármely cellájában a várt érték kisebb, mint 5 volt, Fisher exact statisztikai tesztet végeztünk. Többváltozós analízis esetén logisztikus regressziós analízist végeztünk, melyben megadtuk a számított esélyhányadosok (OR) 95%-os megbízhatósági tartományát, illetve szignifikanciáját is. Az alkalmazott statisztikai módszerek mindegyikében a különbségek 5% alatt számítottak szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

A kutatásban felhasznált 40 apikális periodontitiszes minta 36 betegből származott. A résztvevő betegek kormegoszlása 18-80 év közötti, átlagéletkoruk 49 év. A kontrollként használt 40 gyulladásmentes pulpa-minta 25 betegből származott, akik 17-25 év közöttiek, átlagéletkoruk 23 év.

4.1. Az EBV előfordulása és aktivitása

Az EBV DNS szignifikánsan gyakrabban fordult elő a periapikális léziókban a kontroll mintákhoz viszonyítva (72.5% vs 2.5%, $p < 0.0001$). Az EBV fertőzés lokális aktivációja, amit az EBNA-2 mRNS jelenlétével mutattam ki, ugyancsak szignifikánsan gyakoribb volt a kóros mintákban a kontrollhoz képest (50% vs. 2.5%, $p < 0.0001$).

A periapikális léziókat panaszos ($n=17$) és panaszmentes ($n=23$) csoportokba soroltam az érintett foggal kapcsolatban észlelt panaszok alapján. Mind a panaszos, mind a panaszmentes léziókban szignifikánsan gyakrabban tudunk EBV DNS-t és EBNA-2 mRNS-t kimutatni a kontrollokhoz képest ($p < 0.0001$). Mind az EBV DNS és az EBNA-2 mRNS gyakrabban fordult elő panaszos léziókban, mint a panaszmentesekben, de a különbségek nem voltak szignifikánsak.

A kóros léziók radiológiai átmérője szerinti csoportosításánál kis méretű ($< 5\text{mm}$, $n=19$) és nagy méretű ($\geq 5\text{mm}$, $n=21$) léziókat különítettem el. Mindkét alcsoportban szignifikánsan gyakoribb volt az EBV DNS és RNS előfordulása a kontrollokhoz képest ($p < 0.0001$). Mind az EBV DNS ($p=0.02$), mind az EBNA-2 mRNS ($p=0.002$) szignifikánsan gyakrabban fordult elő a nagyméretű periapikális léziókban a kisméretű léziókhoz képest.

4.2. A panaszos periapikális léziók kockázati tényezői

Az eredmények azt mutatták, hogy a panaszos periapikális léziók és a nagy lézióméret gyakran együttesen fordulnak elő, ezért a továbbiakban logisztikus regressziós analízissel vizsgáltuk meg, hogy az EBV infekciós markerek és a lézióméret közül melyek tekinthetők a panaszosság független kockázati tényezőinek. Az egyváltozós analízis során a három kockázati tényező hatását egyenként vizsgáltuk. Az eredményekből alapján a nagy lézióméret, illetve az EBNA-2 mRNS önmagában szignifikáns mértékben hajlamosított a panaszos megnyilvánulásra. A többváltozós analízisben a három kockázati tényező együttes hatását vizsgáltuk: az EBV infekciós markereket a lézióméretre korrigáltuk, míg a lézióméretet az EBNA-2 mRNS-re. A korrigált esélyhányados értékek és a hozzájuk tartozó konfidencia intervallumok azonban azt jelezték, hogy a nagy lézióméret és a

panaszosság közötti összefüggés tendenciaszintűre ($p=0.08$) legyengült, valamint az EBNA-2 mRNS és a panaszosság közötti szignifikáns összefüggés eltűnt.

Miután a közös analízisben az EBNA-2 mRNS és a nagy lézióméret egymás hatását kölcsönösen gyengítette, feltételeztük, hogy egymás hatását kiegészítő tényezőkről lehet szó. Ennek igazolására a további analízisben a léziókat az EBNA-2 mRNS és a lézióméret kombinálásával csoportosítottuk. A panaszosság gyakoribbá válását azokhoz betegekhez viszonyítottuk, akik panaszmentes és kisméretű léziókkal rendelkeztek. Az eredmények alapján a nagy lézióméret és az aktív EBV fertőzés együttes előfordulása szignifikáns mértékben, mintegy 8.8-szeres eséllyel (OR: 8,80) hajlamosított a lézió panaszos megnyilvánulására.

További betegadatokat összefüggését is vizsgáltuk a periapikális léziók klinikai megjelenésével és virológiai jellemzőivel. Sem a páciensek neme vagy kora, sem az illető fog lokalizációja (alsó-felső, jobb-bal oldal) vagy típusa (metszők, szemfogak, kisőrlők) nem állt statisztikai összefüggésben sem a léziómérettel, sem a panaszossággal, sem a virális markerekkel.

4.3. A HHV-6 előfordulása és aktivitása

HHV-6 DNS szignifikánsan gyakrabban fordult elő a periapikális léziókban a kontroll mintákhoz viszonyítva (20% vs. 2.5%, $p=0.03$). Az A és B altípusokat egyenlő számban tudtuk detektálni a kóros mintákban: 4 minta volt HHV-6A pozitív és 4 minta HHV-6B pozitív. Az egyetlen HHV-6 pozitív kontrollminta a vírus A altípusát hordozta. Egyetlen vizsgált minta sem volt mindkét altípusra egyidejűleg pozitív. HHV-6 mRNS expressziót nem tudtunk kimutatni egyetlen kóros, illetve kontroll mintában sem.

A léziók panaszosság szerint csoportosításánál a HHV-6 DNS-t mind a panaszos és mind a panaszmentes léziókban nagyobb számban tudtunk kimutatni a kontrollokhoz képest (29.4% és 13.0% vs. 2.5%, $p<0.0001$). A logisztikus regressziós analízis során szignifikáns összefüggést ($p=0.008$) tudtunk kimutatni a léziók fokozódó panaszossága és a HHV-6 infekció között. Ennek hátterében a vírus-altípusok jellegzetes eloszlása volt megfigyelhető: a HHV-6B infekciók szignifikánsan gyakoribbak voltak a panaszos periapikális léziókban ($p<0.01$), míg az A altípus a panaszmentes léziókhoz kötődött.

A léziók radiológiai átmérője szerinti csoportosításánál kimutatható volt, hogy a kis (16%) és a nagyméretű léziókban (24%) egyaránt gyakoribb a HHV-6 DNS előfordulása a kontrollhoz képest (2.5%). Az adatok logisztikus regressziós analízissel történő elemzésekor szignifikáns összefüggést tudtunk kimutatni a periapikális léziók növekvő mérete és a HHV-6 infekció előfordulása között

($p=0.018$). A jelenség háttérében ismét megfigyelhető a HHV-6 altípusok jellegzetes eloszlása: mind a négy HHV-6B infekció nagyméretű léziókban fordult elő, ellenben a négy HHV-6A infekcióból 3 kisméretű léziókhöz kötődött.

4.4. A HCMV előfordulása és aktivitása

Négy periapikális mintában tudtam HCMV DNS-t kimutatni, ugyanakkor egyetlen kontroll mintában sem (10% vs. 0%, $p=0.12$). A panaszmentes léziókban gyakrabban fordult elő HCMV DNS, mint a panaszosokban, de a különbség nem volt szignifikáns mértékű (6% vs. 13%). A léziók radiológiai méretét figyelembe véve gyakrabban tudtam detektálni HCMV DNS-t a nagyméretű léziókban, mint a kisméretűekben (14% vs. 5%). HCMV mRNS-t nem volt kimutatható egyetlen kóros, illetve kontroll mintában sem.

4.5. Virális koinfekciók

A vizsgált 40 periapikális minta közül összesen 31-ben (77%) tudunk herpesvírus infekciót kimutatni. HHV-6 monoinfekció egy mintában fordult elő, amely a vírus A altípusát hordozta, a fennmaradó 7 HHV-6 fertőzés mindegyike az EBV-vel koinfekcióban fordult elő. A HCMV esetében hasonló eloszlás volt észlelhető: egy monoinfekció és 3 koinfekció az EBV-vel. Egy mintában hármassal EBV-HHV-6-HCMV infekciót is sikerült azonosítani, amely klinikailag egy panaszmentes és kisméretű lézió volt. Az EBNA-2 mRNS jelenlétét minden többszörös fertőzést mutató lézióban ki tudtuk mutatni. A mono- és a koinfekciót hordozó mintákban hasonló gyakorisággal fordult elő a panaszos klinikai manifesztáció (40.9% vs. 55.6%, $p=0.73$).

4.6. Betegek többszörös periapikális léziókkal

Négy olyan beteg volt, akiktől fejenként kettő-kettő periapikális léziót is vizsgáltunk. Ezen minták elemzése során kimutattuk, hogy az egy betegből származó különböző periapikális léziók számos klinikai és virológiai tulajdonságban eltérhetnek egymástól. Egy beteg esetén különböző HHV-6 pozitivitás, míg két betegben az EBV státusz volt eltérő. A kontroll csoport esetén tíz betegből származott egynél több bölcsességfog, közülük egy beteg esetében eltért a két különböző pulpszövet HHV-6 státusza.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az EBV előfordulása és aktivitása

A kutatás során az EBV aktivitásának vizsgálatán túl a vírus prevalenciáját is meghatároztuk, az infekciós állapottól függetlenül. Az EBV-DNS pozitív periapikális léziók mintegy 2/3-ában tudtunk EBNA-2 mRNS-t kimutatni, ami arra enged következtetni, hogy a periapikális EBV fertőzések nagy részében megtalálható a III-as típusú látencia állapot.

A tanulmányban az EBV infekciós markerek és a lézióméret együttes hatását is vizsgáltuk a lézió panaszosságára egy- és többváltozós logisztikus regressziós analízissel. A multivariáns analízisben a három kockázati tényező együttes hatását vizsgáltuk és láthatóvá vált, hogy a nagy lézióméret, illetve az EBNA-2 mRNS lecsökkentette egymás panaszosságra hajlamosító hatását, így az egyváltozós analízisben kimutatott szignifikáns összefüggések eltűntek. A jelenség hátterében az állhatott, hogy két olyan egymás hatását kiegészítő kockázati tényezőről van szó, amelyek előfordulása egymástól nem teljesen független. A feltételezett kockázati tényezők kombinálásával ugyanakkor igazolni tudtuk, hogy a panaszosság szempontjából valóban kiegészítette egymás hatását az EBNA-2 mRNS és a nagy lézióméret. Mindennek a klinikai jelentősége abban áll, hogy eredményeink szerint amennyiben egy nagyméretű lézióhoz III-as típusú látencia állapotban lévő EBV infekció társul, akkor az nagy valószínűséggel panaszos klinikai manifesztációjú lesz.

Egy korábbi, valós idejű PCR módszerrel végzett kutatás eredményeire alapozva alacsony vírus kópiaszámra számítottunk a periapikális léziókban, ezért nested PCR módszert alkalmaztunk a vírusdetektálás specificitásának és érzékenységének növelése érdekében. A primer kör ciklusszámát 30-ra korlátoztuk a kontamináció lehetőségének minimalizálása céljából.

A kutatás az egészséges pulpszövetre nézve is szolgáltat prevalencia-adatokat, amelyek szerint az EBV DNS és az EBNA-2 mRNS előfordulása elhanyagolható mértékű gyulladástmentes fogbélszövetben. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a beszűrődő B limfociták révén jut be az EBV fertőzés a periapikális gyulladásba.

5.2. A HHV-6 előfordulása és aktivitása

A HHV-6 fertőzést számos esetben mutattak ki marginális periodontitisz esetén, de a vírus krónikus apikális periodontitiszben való előfordulásáról nem lelhető fel adat az irodalomban. Az általunk elvégzett kutatás az első, mely a HHV-6A és B altípusok PCR prevalenciáját vizsgálta krónikus periapikális gyulladásokban és összefüggést keresett a klinikai tünetekkel. A prevalencia

adatok szignifikáns összefüggést mutattak ki a HHV-6 fertőzés előfordulása és az apikális periodontitisz között. Ezzel szemben egészséges pulpaszövetben csupán elhanyagolhatóan alacsony számban tudtuk detektálni a vírust, hasonlóan az EBV-hez és a HCMV-hez.

Az irodalomból jól ismert, hogy a HHV-6 két altípusa eltérő epidemiológiai és biológiai sajátosságokkal rendelkezik. A HHV-6B gyakrabban fordul elő lázas megbetegedésekben az első két életév folyamán (pl. exanthema subitum), míg az A altípus neurológiai és immunológiai megbetegedésekhez köthető. Eredményeink alapján elmondható, hogy az egyes HHV-6 altípusok jellegzetes eloszlást mutattak a különböző léziók között: a HHV-6A főként kisméretű és panaszmentes léziókban, illetve egy kontroll mintában fordul elő, míg a HHV-6B szignifikánsan gyakrabban fordult elő nagyméretű és panaszos léziókban. A két HHV-6 altípus biológiai varianciája tehát megmutatkozott apikális periodontitisz esetén is.

Az a tény, hogy nem tudtuk HHV-6 mRNS-t kimutatni egyetlen mintában sem, arra enged következtetni, hogy látens állapotú HHV-6 infekció volt jelen a periapikális gyulladásokban. Mindazonáltal a látens HHV-6 fertőzés is jelentős morfológiai és funkcionális változásokat képes kiváltani a gazdasejtekben a citokin és kemokin szignalizáció befolyásolása révén.

5.3. A HCMV előfordulása és aktivitása

A HCMV aktivitása a különböző populációkban kétpólusú eloszlást mutat. Az irodalmi adatok egy része magasabb, mintegy 40% és 79.4% közötti mRNS expressziót detektált apikális periodontitiszben, míg más közleményekben 0% és 29.3% közötti értékeket mértek. Eredményeink az alacsony HCMV aktivitású populációkéval mutatnak hasonlóságot. Miután ezen vizsgálatok mindegyike a pp65 régiót vizsgálta, az észlelt különbségek a vírus prevalenciájában feltehetően az különböző földrajzi elhelyezkedésű populációk eltérő epidemiológiai sajátágaiból adódnak.

5.4. Betegek többszörös periapikális léziókkal

Négy esetben több minta is származott egyetlen betegtől (fejenként 2-2 minta). Ezen minták vizsgálatakor arra lettünk figyelmesek, hogy az ugyanazon betegből származó minták különbözhetnek a panaszosságban, lézióméretben és a herpesvírus-fertőzöttségben is. Az adatok arra engedtek következtetni, hogy a helyi gyulladással környezet a fő meghatározója a herpesvírusok előfordulásának apikális periodontitiszben. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a gazdaszervezet herpesvírus- fertőzöttségének ellenére (amire a populáció általánosan magas EBV fertőzöttségéből következtetünk) a gyulladásmentes pulpa-szövetek lényegében mentesek voltak a

vírusfertőzéstől. Az egyes fogakat érintő periapikális kórfolyamatok egymástól függetlenül fejlődnek ki, így az egyénen belüli a különböző lokalizációjú periapikális gyulladások is eltérhetnek egymástól.

5.5. Virális koinfekciók

Az eredmények alapján elmondható, hogy az EBV volt a leggyakoribb herpesvírus a vizsgált periapikális léziókban, amelyet a HHV-6 és végül a HCMV követett. Mind a HHV-6, mind a HCMV gyakran fordult elő koinfekcióban az EBV-vel és mindegyik EBV/HHV-6 és EBV/HCMV koinfekció III-as típusú látencia-állapotban lévő EBV-infekcióval fordult elő. Annak ellenére, hogy a HHV-6 fertőzés szignifikánsan összefüggésben állt a nagyméretű és panaszos léziókkal, további vizsgálatok lennének szükségesek annak elkülönítésére, hogy a HHV-6 fertőzés EBV-függő, vagy EBV-független tényezője-e a panaszos megnyilvánulásnak.

Az EBV és HHV-6 közötti koinfekciót más betegségek kapcsán is leírták, például a mononucleosis infectiosa és a Hodgkin-kór kapcsán. A periapikális gyulladásba beszűrődő EBV fertőzött B limfocitákban feltehetően látenciaváltozás megy végbe, amelynek során I. típusú látenciából III. típusú látencia-állapotba lépnek át. Ép immunitású egyének limfatikus szöveteiben a III-as típusú EBV látencia ritka és átmenetinek számító jelenség. A krónikus gyulladásban szenvedő periapikális környezet ennek ellenére alkalmasnak tűnik III-as típusú látencia-állapotban lévő EBV fertőzött immunsejtek jelenlétére. Ennek hátterében feltehetően az áll, hogy az EBV és HHV-6 fertőzött gazdasejtek Th1 szuppresszív citokin-termelésük révén rejtve maradhatnak az immunfelügyelet sejtjei elől. Az EBV és a HHV-6 fertőzések szinergista módon szerepet játszhatnak a krónikus periapikális gyulladások akut fellángolásában azáltal, hogy hozzájárulnak a lokális immunszuppresszió és az immunmediált szövetkárosodás kialakulásához, valamint a rezidens bakteriális flóra felerősödéséhez. Ezek együttes hatása hozzájárulhat a fokozott periapikális csontfelszívódáshoz és a klinikai tünetek felerősödéséhez.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Apikális periodontitiszben az EBV volt a leggyakrabban detektált herpesvírus, amelyet a HHV-6, majd a HCMV követett. Ezzel szemben a gyulladásmentes kontrollokban a három herpesvírus előfordulása minimális mértékű volt.
2. Az EBV DNS pozitív periapikális léziók mintegy 2/3-ában tudunk EBNA-2 mRNS-t kimutatni, amely a III-as típusú látencia-állapotra jellemző. Mindez arra utal, hogy a periapikális gyulladásba beszűrődő EBV-fertőzött B limfocitákban látenciaváltozás megy végbe III-as típusú látencia-állapotba.
3. Amennyiben egy nagyméretű periapikális lézióhoz III-as típusú látencia-állapotú EBV-infekció társul, az nagy valószínűséggel panaszos lesz.
4. A HHV-6 altípusok jellegzetes eloszlást mutattak a különböző periapikális léziók között: a HHV-6A főként kisméretű és panaszmentes léziókban fordult elő, míg a HHV-6B szignifikánsan gyakoribb volt nagyméretű és panaszos léziókban.
5. Mind a HHV-6, mind a HCMV gyakran fordult elő koinfekcióban az EBV-vel és mindegyik koinfekció III-as típusú látencia-állapotú EBV-infekcióval társult.
6. Az egy betegből származó különböző periapikális léziók számos klinikai és virológiai tulajdonságban tértek egymástól, miután az egyes fogakat érintő periapikális kórfolyamatok is egymástól függetlenül fejlődnek ki. Ezen adatok arra engednek következtetni, hogy a helyi gyulladáshoz vezető környezet a fő meghatározója a herpesvírusok előfordulásának apikális periodontitiszben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az apikális periodontitist, amely alatt a fogak gyökércsúcsa körüli gyulladást értjük, kevert mikrobiális flóra jellemzi, opportunistá Gram-negatív baktériumok dominanciájával. Az utóbbi évek kutatásai alapján azonban felmerült egyes humán herpesvírusok, például az Epstein-Barr vírus (EBV) és humán cytomegalovírus (HCMV) kóroki szerepe is. Kutatásom során az EBV, HCMV és a humán herpesvírus 6 (HHV-6) prevalenciáját, aktivitását és a tünetekkel való összefüggését vizsgáltam.

A tanulmány során 40 apikális periodontitist (17 panaszos és 23 panaszmentes) és 40 gyulladásmentes fogpulpát dolgoztam fel. Az EBV, HCMV és HHV-6 prevalenciákat a virális DNS-ek PCR módszerrel történő azonosításával határoztam meg, míg a vírusok aktivitását a virális mRNS-ek reverz transzkripció PCR amplifikálásával azonosítottam.

EBV DNS és EBNA-2 mRNS szignifikánsan gyakrabban ($p < 0.0001$) volt kimutatható apikális periodontitiszben, mint a kontrollokban (72.5% és 50% vs. 2.5%). Az EBV DNS-t a nagyméretű léziókban szignifikánsan gyakrabban ($p = 0.02$) tudtam detektálni a kontrollokhöz képest. Az EBNA-2 mRNS és a nagy lézióméret együttes előfordulásakor szignifikánsan gyakrabban volt panaszos a lézió (OR=8.80, CI_{95%}: 1.69-45.76). HHV-6 DNS-t szignifikánsan nagyobb számban tudtunk kimutatni az apikális léziókban a kontrollokhöz képest (20% vs. 2.5%, $p = 0.03$). Az apikális minták további csoportosítása során kimutathatóvá vált, hogy a HHV-6B szignifikánsan gyakrabban fordult elő nagyméretű és panaszos léziókban a kontrollokhöz képest ($p < 0.01$). A HHV-6A ugyanakkor panaszmentes és kisméretű léziókhöz kötődött. HCMV infekció alacsony számban volt detektálható mind az apikális léziók (10%), mind a kontrollok (0%) esetében. A leggyakrabban azonosított herpesvírus az EBV (72.5%) volt, amelyet a HHV-6 (20%) és végül a HCMV (10%) követett.

Összefoglalásként elmondható, hogy az EBV és a HHV-6B fertőzések gyakoriak apikális periodontitiszben, különösen a panaszos és nagyméretű léziókban. Eredményeink alapján, amennyiben egy nagyméretű periapikális lézióhoz aktív EBV infekció társul, az nagy valószínűséggel panaszos klinikai manifesztációjú lesz.

8. KÖZLEMÉNYEK

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hernádi K**, Szalmás A, Mogyorósi R, Czompa L, Veress G, Csoma E, Márton I, Kónya J. Herpeszvírusok előfordulása humán periodontitis apicalis mintákban. Fogorv. Szle. "Közlésre elfogadva", 2011.

2. **Hernadi K**, Csoma E, Adam B, Szalmas A, Gyongyosi E, Veress G, Marton I, Konya J. Association of human herpesvirus 6 (HHV-6) subtypes with symptomatic apical periodontitis. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2011; 112: 401-406. **IF: 1.417**

3. **Hernadi K**, Szalmas A, Mogyorosi R, Czompa L, Veress G, Csoma E, Marton I, Konya J. Prevalence and activity of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis lesions. J. Endod. 2010; 36: 1485-1489. **IF: 3.291**

8.2. Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek

1. **Hernadi K**, Szalmas A, Marton I, Konya J. Herpesviral activity in apical periodontitis. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest. 2011.

2. **Hernádi K**. Herpeszvírusok előfordulása és aktivitása humán periodontitis apicalis mintákban. Magyar Mikrobiológiai Társaság, Keszthely. 2010.

3. **Hernádi K**, Szalmás A, Mogyorósi R, Márton I, Kónya J. Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in pulp/periapical inflammation. 2nd Central European Forum +

Iktatószám: DEENKÉTK /179/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Hernádi Katinka

Neptun kód: TCWHEF

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hernádi K.**, Szalmás A., Mogyorósi R., Czompa L., Veress G., Csoma E., Márton I., Kónya J.: Herpeszvírusok előfordulása humán periodontitis apicalis mintákban.
Fogorv. Szle. "közlésre elfogadva", 2011.
2. **Hernádi, K.**, Csoma, E., Ádám, B., Szalmás, A., Gyöngyösi, E., Veress, G., Márton, I., Kónya, J.: Association of human herpesvirus 6 subtypes with symptomatic apical periodontitis.
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 112 (3), 401-406, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.02.007>
IF: 1.417 (2010)
3. **Hernádi, K.**, Szalmás, A., Mogyorósi, R., Czompa, L., Veress, G., Csoma, E., Márton, I., Kónya, J.: Prevalence and Activity of Epstein-Barr Virus and Human Cytomegalovirus in Symptomatic and Asymptomatic Apical Periodontitis Lesions.
J. Endod. 36 (9), 1485-1489, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.008>
IF: 3.291

Összesített impakt faktor: 4,708

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4,708

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.08.31