

A TT VÍRUS (TTV) ELŐFORDULÁSI GYAKORISÁGA ÉS A FERTŐZÉS PATOLÓGIAI
JELENTŐSÉGE

Egyetemi (Ph.D.) doktori értekezés

Szládek Györgyi

Debreceni Egyetem, Általános Orvosi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2004

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A Torque Tenovirus (TTV)

Felfedezés, a virion fizikai tulajdonságai

1997-ben japán kutatók reprezentációs differencia-analízis segítségével egy új DNS vírust izoláltak ismeretlen etiológiájú posztranszfúziós hepatitiszben szenvedő betegből. Az új vírus a beteg nevének kezdőbetűi alapján a TT vírus (TTV) nevet kapta. Később - mivel feltételezték, hogy a vírus elsősorban vérrel és vérkészítményekkel terjed - a Transfusion Transmitted Virus név használata is elterjedt. A legújabb elnevezés – Torque Tenovirus – pedig a vírusgenom alakjára utal (torques = nyaklánc, tenuis/teno = vékony).

A TTV burok nélküli vírus, a virionok átmérője 30-32nm és cézium-kloridos (CsCl) gradiens centrifugálás során mért sűrűségük 1,31-1,35 g/cm³. Az elektronmikroszkóppal készült képeken látható, hogy a vírus a szérumban különböző méretű aggregátumok formájában van jelen.

Genomi szerveződés

A TTV genomja megközelítőleg 3,9 kilobázis (kb) hosszúságú cirkuláris, egyszálú, negatív polaritású DNS. A genom négy, részben átfedő nyitott olvasási keretet (open reading frame, ORF) és egy konzervatív, nem kódoló szakaszt (untranslated region, UTR) tartalmaz. A leghosszabb ORF (ORF1) a prototípus TTV (TA278) szekvenciában az 589.-2898. nukleotidok között helyezkedik el, ez kódolja a kapszid proteint és a TTV Rep proteinjét. Középső részében három hipervariábilis régió (HVR) található. Az ORF2 a 353-as nukleotidtól a 712-ig terjed. A további két ORF távoli splicing helyek összekapcsolódásával (353-711 és 2374-2872 nt, illetve a 353-711 és 2567-3074 nt) keletkezik.

In vitro kísérletekben, egy, a TTV teljes genomját tartalmazó plazmidről három, egyenként 3,0kb, 1,2kb illetve 1,0kb hosszúságú érett messenger RNS íródott át, melyeknek átíródása egy közös belső promoterről kezdődik. In vivo, fertőzött egyének csontvelő sejtjeiben is kimutattak hasonló méretű (2,9kb, 1,2kb ill. 1,0kb) érett messenger RNS-eket.

Az 1,2kb hosszúságú UTR-ben, - amely a 3075.-3853. és 1.-352. nukleotidok között helyezkedik el - található a TTV enhancer és promoter régiója, továbbá lehetséges növekedési faktor kötőhelyeket is tartalmaz, 3' végén pedig egy kb 120 nukleotid hosszúságú guaninban és citozinban gazdag régió található, amely harmadlagos szerkezetet vehet fel. Az UTR tehát a vírusreplikáció és transzkripció szabályozásában játszik szerepet.

A TTV replikáció szervezeten belüli pontos helye, illetve a TTV fertőzés célsejtjei még nem ismertek. Duplaszálú, cirkuláris TTV DNS-t - replikációs intermediereket - kimutattak

májszövetből, illetve érett TTV mRNS-eket detektáltak csontvelőben, ami aktív vírusreplikációra utal ezen szövetekben.

TTV taxonómia

A TTV-t kezdetben a *Parvoviridae* családba sorolták, de a genomot alkotó egyszálú, cirkuláris és negatív polaritású DNS alapján a TTV a *Circoviridae* családba tartozó vírusokkal mutat rokonságot. Egyedi jellemzői, mérete és szekvencia diverzitása miatt nemrég felvetődött a TTV és a más főemlősökből és haszonállatokból izolált hasonló vírusok számára egy új genus (*Anellovirus*) kialakítása.

A TTV genotípusok száma folyamatosan nő, mivel az újabb TTV izolátumok - a DNS vírusok között szokatlanul – gyakran igen nagy divergenciát mutatnak a már ismert genotípusokhoz képest. Az elektronikus adatbázisokban (GenBank) rendelkezésre álló részleges és teljes TTV szekvenciákat több mint harminc genotípusba és a genotípusokat öt genocsoportba sorolják. Az egyes genotípusokba tartozó izolátumok nukleotid szekvenciája között 30%-nál nagyobb eltérés tapasztalható. Az 1. genocsoportba az 1.-6. genotípusok tartoznak ideértve a prototípus TTV izolátumot (TA278) is. A 2. genocsoport PMV-n (17. genotípus)kívül a 7., 8., 22. és 23. genotípusokat tartalmazza. A 3. genocsoportba sorolják az SEN vírus (SENV) típusait (SENV-A – SENV-I). és a SANBAN, TUSo1, TYM9, TNJo1 és TNJo2 izolátumokat. A 4. genocsoportba a YONBAN izolátumok tartoznak. Az ötödik genocsoport olyan, virémiás gyermekek mintáiban detektált izolátumokat tartalmaz, amelyek szignifikáns eltérést mutattak az addig ismert szekvenciáktól.

A TTV epidemiológiája

A TTV világszerte elterjedt, és, bár az epidemiológiai eredmények jelentős mértékben függenek az adott kutatásban használt detektálási módszertől, a normál populációban is 2% - 75%-os fertőzöttség tapasztalható.

A TTV fertőzésről kezdetben azt feltételezték, hogy vérátömlesztés útján történik. Ezt támasztja alá az is, hogy egy vizsgálat során a vérkészítmények több mint fele TTV pozitív volt. Az egészséges populációban világszerte tapasztalt magas előfordulási arány mellett szól, hogy más úton is történhet TTV fertőződés. TTV-virémiás emberek a vírust az epével és széklettel ürítik, illetve nyálban is nagy mennyiségben detektáltak TTV DNS-t, ami valószínűsíti a nonparenterális terjedést. Egy anya-újszülött vérminta-párokat vizsgáló tanulmány eredményei pedig a TTV transzplacentális átvitelét bizonyítják.

Szervtranszplantáción átesett betegek esetében szignifikánsan magasabb az 1. genocsoportba tartozó TTV előfordulási aránya, mint egészségesek körében. Ezen betegek esetében valószínűleg az alkalmazott immunszuppresszív terápia is szerepet játszik a magas TTV fertőzöttségi arányban. Vesebetegeknél a megemelkedett TTV prevalencia már az

átültetést megelőzően, a hemodialízis időszakában megfigyelhető, ami a TTV nozokómiális terjedését valószínűsíti. Az irodalomban gyakran leírnak kevert fertőzéseket, amikor egyazon időben a TTV több genotípusa is kimutatható egy betegben.

Patogenitás

A vírus kóroki szerepe, a számos ezt célzó kutatás ellenére, a mai napig nem tisztázott. Lehetséges, hogy az egyes TTV genotípusoknak vagy genocsoportoknak eltérő a kórokozó képessége illetve, hogy a TTV fertőzés önmagában nem okoz tüneteket, de elősegítheti más kórokozók által okozott betegségek kifejlődését.

Hepatítisz

Mivel a TTV-t először ismeretlen eredetű májgyulladásban szenvedő betegekből izolálták, kezdetben a kutatások is a TTV hepatitiszt indukáló szerepét próbálták igazolni, de az ezirányú vizsgálatok egymásnak ellentmondó eredményeket adtak. Elképzelhető azonban, hogy a TTV-nek csak egyes genotípusai hepatopatogének, vagy a patogenitás függ a vírustitertől és a gazdaszervezetben jelenlevő társfertőző ágensektől.

Egyéb megbetegedések

Akut gyermekkori limfoblasztos leukémiában (ALL) szenvedő betegek esetében vizsgálták a TTV előfordulását csontvelő és PBMC mintákban, de nem találtak összefüggést a TTV állapot és az ALL kialakulása között. Különböző limfóma típusok esetében vizsgálva a TTV jelenlétét, a kapott eredmények alapján - Epstein-Barr vírussal (EBV) együttes fertőzés esetén - a TTV jelenlétének szerepe lehet egyes limfoproliferatív betegségek kialakulásában.

Akut légzőszervi megbetegedések gyermekekben a TTV titer a bronchopneumóniás esetekben szignifikánsan magasabb volt, mint a kevésbé súlyos esetekben – mégsem igazolható, hogy a TTV kiváltó ok lenne, valószínűbb, hogy a vírus a más fertőző ágensek által kiváltott betegség súlyosságát fokozza.

Helicobacter pylori-fertőzött gastritiszes betegek gyomorszövet-mintáiban igen magas TTV titert találtak és a vírustiter jól korrelált a betegség súlyosságával. A gyomorszövetekből elsősorban 3. és 4.gencsoportba tartozó TTV volt kimutatható.

A TTV kimutatására használt módszerek

Polimeráz láncreakció

A TTV kimutatására a legelterjedtebb módszer a polimeráz láncreakció (PCR). A konzervatív UTR-hez tervezett primerek minden TTV genotípust érzékelnek, míg az ORF szekvenciákon alapuló primerek az ebben a régióban tapasztalható nagy genetikai diverzitás miatt egyes meghatározott TTV genocsoportok vagy genotípusok kimutatására alkalmasak.

In situ hibridizáció

Spanyol kutatók 2000-ben fejlesztettek ki egy, amellyel Paraffinba ágyazott májbiopsziás mintákban detektálták a TTV-DNS-t a hepatociták citoplazmájában és magjában *in situ* hibridizációs módszerrel, az ORF1-re specifikus PCR terméket használva hibridizációs próbaként. A fertőzött sejtek elszórta helyezkedtek el a metszetben, és nem mutattak patológiás elváltozásokat.

Szerológiai módszerek

Immunprecipitációs módszerrel, fertőzött egyénből izolált TTV partikulumokat használva antigénként TTV-elleni antitesteket mutattak ki véradoók és non A-G hepatitiszes betegek szérumból. Immunoblot módszert alkalmazva, amely az ORF 1 régióból kialakított rekombináns proteint használ antigénként, is sikerült TTV-elleni antitesteket kimutatni.

Biológiai vizsgálatok

Ez idáig nem sikerült olyan sejtvonalat előállítani, amelyben a TTV replikálna. Kompetens TTV DNS-sel történő transzfekció mRNS átíródást indukál ugyan a fertőzött sejtenyészetekben, de DNS replikáció nem történik..

Kísérleti körülmények között sikerült *Rhesus* majmokat humán TT vírussal fertőzni. Az orálisan vagy parenterálisan fertőzött állatok 4-10 nap után virémiássá váltak, a TTV kimutatható volt a májban, az epében és a székletben is, de a fertőzés semmilyen patológiás hatást nem váltott ki náluk.

2. A Humán Papillomavírus (HPV) és szerepe egyes daganatos megbetegedésekben

A HPV a *Papillomaviridae* családba tartozó, kisméretű, burok nélküli vírus, genomja megközelítőleg 8kb hosszú, duplaszálú, cirkuláris DNS. A HPV-nek több mint 100 genotípusa ismert, minden típusa epitheliotrop. Több mint 40 típusa a nyálkahártyákat fertőzi.

A gége tumoros megbetegedéseinek kialakulásához vezető körülmények nem teljesen tisztázottak, kémiai ágensek – alkohol, dohánytermékek – mellett felmerült a HPV egyes típusainak lehetséges kóroki szerepe is, mivel a virális DNS gyakran kimutatható a tumorszövetekből. A HPV szakirodalom azonban nem egyöntetű annak megítélését illetően, hogy a vírus jelenléte a gége nyálkahártyájában milyen hatással van a tumor-progresszióra. Amíg egyes tanulmányok szerint a HPV fertőzés önmagában nincs hatással a betegség kimenetelére vagy a HPV pozitív tumorok prognózisa jobb, más kutatók szerint a HPV-fertőzött tumorok rosszabb kimenetelűek, mint azok amelyekből nem mutatható ki a vírus.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen a TTV előfordulási aránya vesetranszplantált betegek körében az egészséges populációhoz viszonyítva?
2. A TTV perzisztens fertőzést okoz-e vesetranszplantált betegekben?
A tartósan TTV-fertőzött betegekben a vírus azonos variánsa detektálható-e hosszú időn keresztül?
3. Milyen a TTV előfordulási aránya a fej-nyak régió tumoros megbetegedésében szenvedő betegek körében?

Milyen hatása van a TTV-nek HPV-vel történő koinfekció esetén a tumoros megbetegedés kimenetelére?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Vizsgálati csoportok, klinikai minták, DNS izolálás.

A virális fertőzöttséget és annak esetleges hatását az alábbi betegcsoportokon vizsgáltuk.

a) Vesetranszplantáción átesett betegek vérmintái. Kilencvenkét vesetranszplantált beteg esetében a transzplantációt követő időszakból származó – rutin CMV vizsgálat céljára levett - heparinos vérmintákból perifériális leukocitákat izoláltunk ezen sejtekből vontuk ki a DNS-t a PCR-es vizsgálatokhoz. A betegek illetve a beültetett szervek HBV, HCV és CMV státuszáról és az átültetést követő terápiában alkalmazott gyógyszerekről is voltak adataink. A TTV fertőzés perzisztenciájának megállapítására 31 beteg esetében nyomonkövetést végeztünk, a követés 113-372 napos tartama alatt az egyes betegektől 2-6 különálló, egymást követő időszakból származó vérminta érkezett. Kontrollként 66 egészséges egyén vérmintáit használtuk.

b) Gégetumoros betegekben tumorszövet mintái. 40 beteg műtét során eltávolított szöveteiből, a tumor centrális részéből származó sejtekből izolált DNS mintákban PCR módszerrel mutattuk ki a virális DNS-t. A 40 beteg közül 25 gégecarcinomában, tíz rekurrens laringeális papillomatozisban, öt pedig malignizálódott papillomában szenvedett. A betegekben talált virális prevalencia adatokat összehasonlítottuk 40 egészséges egyén szájüregi exfoliált sejtjeiből származó DNS mintáinak PCR-es eredményeivel.

Az összes mintából a DNS-t proteinázos emésztést követően fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú elegyével nyertük ki.

2. Virális DNS kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR).

a) TTV kimutatása két egymástól független PCR módszerrel. Az egyik módszer, nested PCR, amely a TTV genom konzervatív UTR régiójához tervezett primerekkel (NG147-NG133/NG132-NG134) az eddig ismert összes TTV genotípus kimutatására alkalmas (UTR-PCR). A másik, seminested PCR során a TTV genom ORF1 N22-es régiójához tervezett primerekkel (NG059-NG063/NG061-NG063) az egyes genocsoportba tartozó TTV variánsokat mutattuk ki (ORF-PCR)

A PCR módszerek érzékenységének meghatározása. Pozitív reakciókból nyert és kitisztított PCR termékeket PinPoint Xa2 plazmidvektorba klónoztunk be. A PCR reakcióelegybe ismert mennyiségű plazmid kópiát tartalmazó minta sorozathígítását vittük be mintaként, ennek segítségével határoztuk meg a két módszer érzékenységét. Az UTR-PCR érzékenysége két nagyságrenddel nagyobbak bizonyult, mint az ORF-PCR érzékenysége.

b) HPV kimutatása A gégetumoros szövetekből a HPV DNS-t a mukotrop HPV típusok kimutatására alkalmas konszenzus MY/GP-PCR segítségével mutattuk ki az MY09-MY11/GP5-GP6 primereket használva.

3. Vesetranszplantált betegekben detektált TTV variánsok összehasonlítása.

a) Egyszálú konformációs polimorfizmus analízis (SSCP). TTV pozitív betegek esetében az ORF- és UTR-PCR-ek második köréből származó termékeket SSCP analízisnek vetettük alá. A minták két perces 72°C-on történő denaturálását 5%-os poliakrilamid gélen történő elektroforézis követte. Az eredményt ezüst-nitrát festéssel tettük láthatóvá.

b) Automata szekvenálás. A nyomonkövetett TTV pozitív betegek esetében az ORF-PCR nested köréből származó 271 bázis hosszúságú termékeket - Microcon YM-100-as oszlopon történő tisztítást követően - BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit felhasználásával az NGO61 (sense) és NGO63 (antisense) primereket alkalmazva mindkét irányban megszekvenáltuk. A nukleotid szekvenciákat ABI Prism 310 automata szekvenáló készülék segítségével olvastuk le.

c) TTV genotípus megállapítása. Az automata szekvenálás során kapott nukleotid szekvenciákat a GenBank adatbázisban található referencia szekvenciákhoz hasonlítva állapítottuk meg a detektált TTV variánsok genotípusát. A szekvenciák analízise során kapott homológia mátrix alapján filogenetikai fát hoztunk létre a vizsgált izolátumok rokonsági fokának szemléltetésére. A nukleotid szekvenciák alapján megállapítottuk az adott genomi szakasról átíródó polipeptid valószínű aminosav sorrendjét és az így kapott aminosav szekvenciákon is elvégeztük az összehasonlító elemzést. Az nukleotid és aminosav-szekvenciák elemzését a DNAMAN szoftver segítségével végeztük.

4. Statisztikai módszerek

A vesetranszplantált betegek és egészséges véradók adatait (nem és kor szerinti megoszlás, TTV prevalencia) Yates-corrected X^2 teszt segítségével hasonlítottuk össze. Fisher's exact tesztet alkalmaztunk abban az esetben, ha a kontingencia-táblázat valamely cellája kevesebb mint 5 elemet tartalmazott. A median értékeket Mann-Whitney féle non-parametrikus teszttel hasonlítottuk össze.

A gégetumoros szövetekben és buccalis epithel sejtekben tapasztalt TTV és HPV előfordulási adatokat Fisher's exact teszt segítségével elemeztük, a tumormentes túlélés vizsgálatát Kaplan-Meier teszttel végeztük.

A statisztikai elemzéseket az SPSS szoftver (SPSS Inc., Chicago, IL,USA) segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

I. TT vírus vesetranszplantált betegekben

TTV prevalencia

Munkánk során 92 vesetranszplantált beteg és 66 egészséges véradó perifériális limfocita mintáiban vizsgáltuk a TTV DNS jelenlétét UTR- és ORF-PCR segítségével. Az UTR-PCR, amely gyakorlatilag minden TTV genotípus érzékelésére képes módszer, 100%-os (92/92) pozitivitást mutatott a vesetranszplantáltakban, az egészséges kontroll csoportban pedig 95%-os (63/66) volt a fertőzöttség. Az ORF-PCR-rel vesetranszplantáltakban 58%-ban (53/92), véradóknál 20%-ban (13/66) volt kimutatható 1 genocsoportba tartozó TTV ($p_{\chi^2} < 0,00001$). Az 1 genocsoportba tartozó TTV-pozitív illetve TTV-negatív betegek csoportja között nem volt szignifikáns különbség a transzplantáció idején betöltött életkor (38,9 szemben 39,6 év); nemek szerinti megoszlás (férfi/nő arány: 1,65 szemben 1,78; $p_{\chi^2} = 0,96$) és a transzplantációt követően a vizsgálatig eltelt idő (median: 26 szemben 33 hónap; $p = 0,33$) tekintetében.

Nyomonkövetési vizsgálatok

Harmincegy vesetranszplantált beteg 2-6 egymást követő mintájában vizsgáltuk az 1 genocsoportba tartozó TTV jelenlétét a seminested ORF-PCR módszerrel. A median követési idő 230 nap volt (min. 97, max. 372 nap). A nyomonkövetett csoport statisztikailag nem különbözött a nem követett betegek csoportjától a transzplantáció idején betöltött életkor (42,7 szemben 38,5 év); nemek szerinti megoszlás (férfi/nő arány: 1,58 szemben 1,77; $p_{\chi^2} = 0,98$), az 1 genocsoportba tartozó TTV fertőzöttség (14/31 szemben 39/61; $p_{\chi^2} = 0,52$) valamint a transzplantáció és a TTV kimutatás között eltelt időtartam (median: 20 szemben 30 hónap; $p = 0,72$) tekintetében. A követés időtartama alatt két esetben olyan betegeknek, akiknek első mintái TTV pozitívak voltak, a követés 182. illetve 210. napján vett mintái TTV negatívnak bizonyultak, míg három beteg esetében, akiknek első mintáiból nem volt kimutatható TTV DNS, a követés 28., 182. illetve 307. napján vett minták TTV pozitívak voltak. A nyomonkövetett betegek többségének TTV állapota a követés időtartama alatt konzisztens volt, 12 tartósan pozitív, míg 14 tartósan TTV negatív volt.

Vesetranszplantáltakban előforduló TTV variánsok.

a) Az egyszálú konformáció polimorfizmus analízis (SSCP) eredménye

Tartósan TTV pozitív betegek egymást követő 2-3 mintájából származó UTR illetve ORF-PCR termékeket vizsgáltunk meg egyszálú konformáció analízissel (SSCP). Az UTR-PCR termékek SSCP mintázata egységes volt a vizsgált betegekénél, ami megfelel az UTR régió konzervatív jellegének, míg az ORF-PCR SSCP mintázata, a régió magas variabilitásának megfelelően nagy különbségeket mutatott a vizsgált betegek között, de az egyes betegek

különböző időpontokból származó mintái egységes mintázatot mutattak, jelezve egyedi TTV variánsok tartós jelenlétét a nyomonkövetés ideje alatt.

b) Nukleotid-szekvenálási eredmények

A 12 tartósan TTV (ORF-PCR) pozitív beteg minden mintájának második körös amplikonjainak (egy-egy beteg esetében 2-6, 113-363 nap különbséggel gyűjtött minta) szekvenciaadatai megerősítették, hogy a betegekben egy-egy TTV variáns volt jelen a nyomonkövetés teljes időtartama alatt. A követés összesített időtartama 2924 nap volt, ez alatt 4 nukleotid változás történt, mindegyik más betegben. A nukleotid szekvenciákat 74 aminosav hosszúságú peptid szekvenciákká fordítottuk le. A transzláció minden esetben egyetlen leolvasási keretben volt lehetséges, amely az NGO61-es primert követő első nukleotidot használta a következő kodon első nukleotidjaként. Az előbbieken említett négy nukleotid változás három esetben eredményezett aminosav változást a 9., 26., illetve 63. pozícióban, a negyedik esetben csendes mutáció alakult ki a követés során.

c) Szekvencia elemzés, a genotípus meghatározása

A 12 tartósan TTV pozitív beteg mintáiból nyert DNS szekvenciákat összehasonlítottuk a GenBank adatbázisban található teljes vagy majdnem teljes szekvenciák hasonló szakaszaival. A szekvencia elemzés alapján filogenetikai fát építettünk fel 'neighbor-joining' módszer segítségével. 1, 2, illetve 3 genotípusú TTV-t lehetett azonosítani 3, 6 illetve 3 beteg esetében. A lefordított aminosav szekvenciák alapján is összeállított filogenetikai fa hasonló megoszlást mutatott, bár a kiszámított homológia mátrix az aminosavak szintjén valamivel alacsonyabb homológiát mutatott, mint nukleotid szinten.

Az eredményekből levonható következtetések

Az irodalomból ismert adatokat, melyek szerint a TTV 1. genocsoportba tartozó típusai nagyobb gyakorisággal fordulnak elő a transzplantáción átesett betegek körében, mint az egészséges populációban, a mi eredményeink is megerősítik. A felhasznált 1. genocsoportra specifikus PCR módszer a TTV genom egy polimorf régióját szaporítja fel, így lehetőség volt a fertőzést okozó variánsok vizsgálatára. A tartósan TTV pozitív betegek egymást követő mintáiban detektált TTV variánsok összehasonlítása azt bizonyította, hogy a vesetranszplantált betegekben a TTV azonos, az 1., 2. illetve 3. genotípusba tartozó variánsa okozott tartós fertőzést. Ezen tanulmányban a TTV-t leukocitákból mutattuk ki. Mivel a vírus nem egyenletesen oszlik meg az egyes vérkompartmentek között, megvizsgáltuk a legalább egy mintájában TTV pozitív 17 nyomonkövetett beteg közül 16 esetében plazma mintájukat is. UTR-PCR-rel 15 plazma volt TTV pozitív (94%), míg az ORF-PCR 12 plazma esetében volt pozitív. Az UTR-PCR érzékenysége két nagyságrenddel nagyobb volt mint az ORF-PCR érzékenysége. Ennek megfelelően az ORF-PCR esetében tapasztalt különbség a leukocita illetve plazma- minták között, valószínűleg az eltérő vírusmennyiségnek az eredménye.

Vesetranszplantált betegekben egy domináns TTV variáns jelenlétét lehetett igazolni. A hosszútávú követéses vizsgálatok felfedték, hogy a betegek többségének állandó volt, míg néhányuknak megváltozott a TTV-állapota. A három TTV pozitívvá vált beteg egyike sem kapott a követés időtartama alatt vért vagy vérkészítményt, ami egy új fertőzés eredete lehetett volna. A betegek TTV-állapota sem a transzplantációs korról, sem az operációt követő időszakban kapott kezeléssel, sem más vírusfertőzések – Cytomegalovírus (CMV) vagy Hepatitis-B vírus (HBV) - esetleges jelenlétével nem mutatott összefüggést. A CMV szeropozitivitás – függetlenül a TTV állapottól - gyakori volt a transzplantáció idején (>80%). A CMV antigenémia tesztel kimutatható CMV reaktiválódás szintén független volt a TTV jelenlététől. HBV fertőzöttség kis számban fordult elő a nyomonkövetett betegek csoportjában, a négy HBsAg pozitív beteg közül egy volt 1. genocsoportba tartozó TTV-pozitív. A vizsgált betegek egyike sem volt HIV-val fertőzött. A fentieket figyelembe véve megállapítható, hogy a transzplantációt követő időszakban alkalmazott kezelés nem volt hatással a betegek TTV állapotára.

A nyomonkövetéses vizsgálat felfedte, hogy az 1. genocsoportba tartozó TTV-val történő tartós fertőzöttség gyakori jelenség vesetranszplantált betegek körében. Ez a tény az ellen a lehetőség ellen szól, hogy a TTV magas előfordulási gyakorisága ismételt újrafertőződésekből származna, mivel egy új fertőzés - figyelembe véve a TTV izolátumok nagy heterogenitását – valószínűleg egy másik, eltérő nukleotid-szekvenciájú variáns megjelenését okozná, az általunk vizsgált betegekben viszont egy-egy TTV variáns jelenlétét lehetett kimutatni a követés teljes időtartama alatt. Az N22 régió a TTV genom egy igen variábilis része, mely a virion felszínén kifejeződő humorális epitópokat kódolhat, mutációt azonban alig lehetett detektálni ezen területen. A gazdaszervezet immunrendszerének hatása oka lehet az újabb TTV variánsok és genotípusok kialakulásának, ez a hatás valószínűleg leginkább a genom hipervariábilis régióit érinti. A gyógyszeres immunszuppresszió hozzájárulhat ahhoz, hogy az egyes TTV variánsok hosszú ideig perzisztálnak vesetranszplantált betegekben.

II. TTV és HPV előfordulás gégetumoros betegekben és egészséges egyénekben

Egészséges egyének. A 40 szájnyalakahártya sejtekből származó DNS minta összehasonlítási alapként szolgált a gégenyalakahártya tumoraiban tapasztalt vírusállapothoz.

Rekurrens papillomatozisos betegek. A 10 betegből sebészi úton eltávolított gégepapillomák a HPV fertőzés jellegzetes szöveti tüneteit mutatták.

Malignizálódott papillomás betegek. Mind az öt beteg esetében a kiindulási diagnózis diszpláziát mutató papillomatózis volt, amely később malignus transzformációba fordult. Az alacsony esetszám miatt ezen betegcsoport esetében nem végeztünk statisztikai analízist.

Gége laphámsejtes karcinómájában szenvedő betegek. A betegeket két csoportra osztottuk a kórlefolyás alapján. Az egyik csoportba azon betegek kerültek, akiknél a primer tumor kimetszése után nem jelentkezett recidíva vagy metasztázis, a másik csoportban – tumorprogressziós csoport - ezen események valamelyike megfigyelhető volt a nyomonkövetés során.

A vizsgálati csoportokban tapasztalt TTV, HPV prevalencia és a koinfekciós esetek számszerű eredményeit az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

A különböző vizsgálati csoportok virológiai állapota.

Vizsgálati csoportok	TTV pozitív (UTR-PCR)	TTV pozitív (ORF-PCR)	HPV pozitív	TTV -HPV koinfekció
egészségesek (N=40)	29 (72.5%)	2 (5%)	10 (25%)	1 (2.5%)
gégepapillomás betegek (N=10)	8 (80%)	2 (20%)	10 (100%)	2 (20%)
malign.papillomás betegek (N=5)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)
laphámsejtes carcinomás betegek (N=25)	22 (88%)	11 (44%)	12 (48%)	8 (32%)
progresszió mentes (N=14)	11 (78.6%)	3 (21.4%)	3 (21.4%)	0 (0%)
tumorprogressziós (N=11)	11 (100%)	8 (72.7%)	9 (81.8%)	8 (72.7%)

Az UTR-PCR-rel detektálható TTV pozitivitás minden esetben igen magas volt, az vizsgálati csoportok között e tekintetben nem volt statisztikai különbség, így a statisztikai analízis és a további elemzések során az 1. genocsoportba tartozó TTV pozitivitásra koncentráltunk

TTV (1. genocsoport) és HPV kettős fertőzés hatása a progressziómentes túlélésre

Virológiai állapotukat figyelembe véve összehasonlítottuk a 25 gégetumoros egyén betegségének kimenetelét. A kettős fertőzöttség aránya szignifikánsan magasabb volt a tumorprogressziós betegek körében, mint a progresszió mentes betegek esetében.

Összehasonlítottuk a TTV és HPV mentes (40%; 10/25), a csak az egyik vírussal fertőzött (28%; 7/25) illetve a mindkét vírust hordozó betegek (32%, 8/25) tumormentes túlélését. A vírusmentes betegek és a csak TTV- vagy csak HPV-fertőzött betegek tumormentes túlélése nem különbözött szignifikánsan (Kaplan-Meier $p=0,9571$), viszont a koinfekciós betegek tumormentes túlélése szignifikánsan rosszabb volt összevetve a fent említett két csoportéval (Kaplan-Meier $p=0,0017$; $p=0,0023$). Ezek alapján a csak az egyik vírussal fertőzött és a vírusmentes betegekből egy összevont csoportot képeztünk (68%; 17/25) és így hasonlítottuk össze tumormentes túlélésüket a kettősen fertőzött (32%; 8/25) betegekével. Mind a nyolc kettősen fertőzött beteg esetében tapasztalható volt tumorprogresszió, míg a többi beteg esetében csak 17,6%-ban (3/17) fordult elő metasztázis vagy recidiva. A kettősen fertőzött betegek progressziómentes túlélése szignifikánsan rosszabb volt mint a csak az egyik vírussal fertőzött illetve vírusmentes betegek csoportja esetében ($p<0,0001$).

Az eredményekből levonható következtetések

Munkánk során megvizsgáltuk a TTV és a HPV előfordulási arányát és a fertőzés esetleges hatásait a gége tumoros megbetegedéseiben. Vizsgálataink legfontosabb eredményei a következők voltak: Az össz-TTV (1.-5. genocsoport) előfordulási gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a vizsgálati csoportokban és jól korrelált az általunk korábban, egészséges véradók PBMC mintáiból kimutatható értékkel (95%). Azon tumoros betegeknél, akiknél a műtét utáni időszakban komplikáció lépett föl - a tumor recidivált vagy metasztázis alakult ki -, szignifikánsan nagyobb volt az 1. genocsoportba tartozó TTV előfordulása, mint a többi vizsgálati csoportban. A gége laphámsejtes karcinómájában szenvedő betegek között szignifikánsan rosszabb volt a TTV-vel és HPV-vel egyaránt fertőzöttek komplikáció mentes túlélése.

A kapott eredmények mögött a következő magyarázatok állhatnak:

a) Az 1. genocsoportba tartozó TTV könnyebben fertőzi meg a gégenyálkahártya bizonyos sejtjeit vagy HPV-fertőzött szöveteit.

Mivel az egészséges szájnyálkahártyában (5%), a papillomatozisos betegek esetében (20%), illetve a progressziómentes karcinómás betegeknél tapasztalt (21,4%) prevalencia nem tért el szignifikánsan a hasonló földrajzi területen egészséges véradók vérében detektált TTV pozitivitástól (18,5%-20%), nem valószínű, hogy a tumorprogressziós karcinómás betegek

esetében tapasztalt magas TTV-prevalencia a vírus szöveti preferenciájával lenne magyarázható. A TTV-nek a HPV-fertőzött szövetek iránti esetleges preferenciájának ellentmond a 100%-ban HPV-fertőzött papillomás betegeknél tapasztalt alacsony TTV prevalencia.

b) Az 1. genocsoportba tartozó TTV esetleg preferenciát mutat a megváltozott proliferációjú sejtek iránt.

Ezt a lehetőséget az a tény teszi valószínűtlenné, hogy összevetve az egészséges nyálkahártyából származó mintákkal, sem a papillomatozisos betegek, sem a tumorprogresszió-mentes karcinómások esetében nem tapasztaltunk megemelkedett TTV-prevalenciát, holott mindkét esetben jelen vannak abnormális proliferációjú sejtek.

c) Az 1. genocsoportba tartozó TTV és a HPV eddig ismeretlen módon történő interakciója eredményezi a tumorprogressziót.

Eredményeink alapján ez a magyarázat a legvalószínűbb. A vizsgálati csoportok közül csak a tumorprogressziós karcinómás betegek esetében tapasztaltunk kiemelkedően magas koinfekciós arányt. Szintén ezt a lehetőséget támasztja alá a malignus transzformáción átesett papillomatozisosok esetében tapasztalt magas koinfekciós arány.

A feltételezett együttműködés hátterében számos folyamat állhat. A TTV-ről leírták, hogy immunmodulatív hatása lehet, így a TTV fertőzés lokálisan meggyengítve az immunválaszt, megakadályozhatja a HPV fertőzött sejtek eliminációját. A két vírus együttes jelenléte egyazon sejtben megváltoztathatja a sejtmetabolizmust, módosulhat a HPV integráció, megváltozhatnak az antigén-prezentáló útvonalak, megnőhet a proto-onkogének és/vagy a sejtés/virális anti-apoptotikus fehérjék expressziója.

Összefoglalva, eredményeink azt sugallják, hogy az 1. genocsoportba tartozó TTV és HPV együttes jelenléte a szövetekben elősegíti a tumorprogressziót laphámsejtes gégecarcinoma esetében.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- I. A TT vírus 1. genocsoportba tartozó variánsai szignifikánsan nagyobb arányban fordulnak elő vesetranszplantáción átesett betegek vérében, mint a hasonló korú és nemi összetételű egészséges populációban ($p_{\chi^2} < 0,00001$). Az össz-TTV (1.-5. genocsoport) előfordulási aránya viszont nem különbözik szignifikánsan a két csoport esetében.
- II. Vesetranszplantált betegek esetében az 1. genocsoportba tartozó TT vírussal való fertőzöttség tartós, a vírus eliminálódása illetve új fertőzés megjelenése ritka esemény. A tartós fertőzést egy-egy beteg esetében a vírus azonos variánsa okozza, míg az egyes betegekből izolált TTV variánsok nukleotidszekvenciája egymástól nagy mértékben különbözik.
- III. A gége különböző tumoros megbetegedéseiben szenvedő betegek tumorszöveteiben tapasztalt össz-TTV-fertőzöttség (1.-5. genocsoport) nem tért el szignifikánsan az egészséges egyének szájnyálkahártyájában tapasztalt fertőzöttségtől. A gége laphámsejtes karcinómájában szenvedő betegek esetében, ha a tumoros szövetekben az 1. genocsoportba tartozó TTV-fertőzés HPV fertőzéssel társul, szignifikánsan rosszabb a betegek tumorprogresszió-mentes túlélése, mint a csak az egyik vírussal fertőzött, illetve a vírusmentes betegek esetében ($p < 0,0001$).

KÖZLEMÉNYEK

1. Az értekezésben felhasznált közlemények:

- I. Szládek Gy, Juhász A, Asztalos L, Szőke K, Murvai M, Szarka K, Veress Gy, Gergely L, Kónya J.
Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients. (2003)
Arch Virol 148: 841-851.
IF: 1.876
- II. Szládek Gy, Juhász A, Kardos G, Szőke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Márton I, Kónya J, Gergely L, Szarka K.
High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma.
Journal of Clinical Pathology (közlés alatt)
IF: 2.966

2 Egyéb közlemények

Szőke K, Szládek Gy, Szarka K, Juhász A, Veress Gy, Gergely L, Kónya J.
Human cytomegalovirus load in the peripheral blood determined by quantitative competitive polymerase chain reaction. (2001)
Acta Microbiol Immunol Hung 48: 313-321.
IF: -

Szőke K, Sáy T, Krasznai Z, Hernádi Z, Szládek Gy, Veress Gy, Dillner J, Gergely L, Kónya J.
Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities. (2003)
J Med Virol 71: 585-592.
IF: 2.371

Szőke K, Szalmás A, Szládek Gy, Veress Gy, Gergely L, Tóth FD, Kónya J
IL-10 promoter nt -1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. (2004)
J Interferon Cytokine Res 24: 245-251.
IF: 2.120

Szalai E, Gerlei Zs, Szlávik J, Szládek Gy, Patel R, Hunyadi J, Gergely L, Juhász A.
Prevalence of human herpesvirus-8 infection in HIV positive patients with and without
Kaposi's sarcoma in Hungary. (2004)
FEMS Immunol Med Microbiol (közlés alatt)
IF: 1,789

3. Konferencia prezentációk

Szládek Gy, Kónya J, Juhász A, Szarka K, Gergely L.
A TT vírus (TTV) előfordulása vesetranszplantált betegekben
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2000. VIII. 24-26., Keszthely

Szládek Gy, Kónya J, Szőke K, Gergely L.
TT vírus (TTV) genotípusok perzisztenciájának vizsgálata vesetranszplantált betegek
nyomonkövetésével
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2001. X. 10-12, Balatonfüred

Szládek Gy, Kónya J, Szőke K, Gergely L.
Rekombináns antigén előállítás a TTV-ORF 1 N22-régiójának szekvenciája alapján
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2002. X. 9-11., Balatonfüred

Szládek Gy, Kónya J, Szőke K, Gergely L.
Preparation of recombinant antigene from the ORF1 region of the TT virus (TTV) genome
14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2003. X. 9-11.,
Balatonfüred

Szládek Gy, Juhász A, Kardos G, Major T, Tar I, Gergely L, Szarka K.
A TT vírus (TTV) koinfekció fokozhatja a Humán Papillomavírus (HPV) onkogén hatását
gégetumorkban.
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2004. X. 6.-9., Keszthely