

Célkitűzéseink közül egyedül a vénás és artériás endothel sejt kultúrák *Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) hatására bekövetkező változásainak vizsgálatát nem sikerült teljesítenünk. Ennek az volt oka, hogy nem sikerült beállítani az artériás endothel sejt tenyésztés rendkívül bonyolult módszerét. Így a köldökzsinórból származó véna eredetű endothel sejtekkel nyert eredményeinket sem volt érdemes leközozni. Továbbá, korábban az MBL génen előforduló pontmutációkat kapcsolatba hozták a súlyos atherosclerosis kialakulásával. Azonban a pályázat benyújtása után kapott saját eredményeink (Rugonfalvy-Kiss et al., *Stroke*, 2005, 36: 944-948) és a pályázat benyújtása után megjelent más publikációk arra utaltak, hogy az MBL allél variációknak nincsen, vagy csak kis jelentőségük van, a carotis endarterectomia utáni restenozis kialakulásával, az MBL variáns alléloknak nincs hatása a coronáriák diszfunkciójára, az MBL deficiencia nincs kapcsolatban a cerebrovascularis (stroke) esetekkel és súlyos *C. pneumoniae* és más fertőzésekkel (Bultink IE et al, *Arthritis Res Ther.* 2006, 8:R183; Jönsen A, *Lupus*, 2007, 16:245-53; Aittoniemi J et al, *Int. J. Cardiol.* 2004 November, 97:317-8). Ugyancsak közölték, hogy *C. pneumoniae* fertőzés nincs összefüggésben az endotheliális károsodás jellemzőivel coronaria ischemiában szenvedő betegekben (Ferrari M et al, *Cardiovasc Ultrasound* 2005, 27:3-12; Hoymans VY et al, *Int J Cardiol.* 2008, 123:277-82). Érdekes módon azonban, fertőzések, beleértve a *C. pneumoniae* fertőzést is, endotheliális diszfunkciót idéztek elő afrikai egyéneknél, de nem kaukázusi eredetű egyéneknél (Marchesi S et al, *Atherosclerosis*, 2007, 19:227-34).

Mindezek alapján a rész-célkitűzéseket kis mértékben módosítottuk, annak érdekében, hogy a pályázat főcélkitűzését, azaz a atherosclerosis molekuláris pathogenezisének és genetikai hátterének fertőzésekkel való összefüggését a pályázat benyújtása után publikált eredmények felhasználásával tanulmányozzuk.

1. Vizsgáltuk a *C. pneumoniae* és human cytomegalovirus (HCMV) potenciális szinergista hatását az atherosclerosis kialakulására: a./ a két patogén esetleges jelenlétét ugyanabban a carotis plakkban (Virók D. et al, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2006, 53:35-50), b./ a két patogén egymásra hatásának mechanizmusát bizonyos, az atherosclerosis kialakulását befolyásoló celluláris gének expressziójának mérésével human monocytá sejt vonalon (Virók D. et al, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2006, 53:35-50), c./ a HCMV és *C. pneumoniae* fertőzés hatását a human dendritikus sejtek érésére (Kis Z et al, *Arch. Virol.* 2006, 151:2277-2287 és Kis Z. et al., *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008, 52:1-11), d./ a *C. pneumoniae* ismételt fertőzések biológiáját és immunológiáját egérben, az atherosclerosis-sal valószínűleg kapcsolatba hozható krónikus fertőzések mechanizmusának megértése érdekében (Kis Z et al, *Inflamm Res*, 2008, 57:1-9), e./ összefoglaltuk a HCMV látencia mechanizmusáról kialakított jelenlegi tudományos álláspontot (Burian K and Gönczöl É. *Latency strategies of herpesviruses.* Springer, 2007, Ed. J. Minarovits, E. Gönczöl, T. Valyi-Nagy).

A human cytomegalovirus (HCMV) kongenitalis károsodást és szervtranszplantáció utáni szövődeményeket okozhat, de kapcsolatba hozzák az atherosclerosis kialakulásával is. Közöltük korábban, hogy az előzetes cytomegalovirus fertőzés súlyosbítja a későbbi *C. pneumoniae* fertőzés által kiváltott korai atherosclerotikus plakkokat egérben (Burian K et al, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8:1263-1266). A HCMV a populáció nagy részét tünetek nélkül megfertőzi és a fertőzés után gyakran látens vírus hordozás alakul ki. A myeloid eredetű hematopoietikus sejteket, elsősorban a myeloid progenitor sejteket, monocytákat és dendritikus sejteket (DC) tartják a legfontosabb HCMV reservoir sejteknek. A DCs professzionális antigén prezentáló sejtek. *In vitro*, a perifériás vérből nyert monocyták GM-CSF és IL-4 jelenlétében éretlen DC-vé fejlődnek, amelyek TNF-alfa vagy mikrobiális komponensek hatására érett DC-vé differenciálódnak. A DC fenotípusa bizonyos felszíni molekulák kifejeződésével, vagy a kifejeződés hiányával meghatározható. Az atherosclerotikus plakkokban és a plakkok kialakulására prediszponált artéria szakaszokon DCs halmozottan fordulnak elő.

Vizsgáltuk, hogy a *C. pneumoniae*-val és HCMV-val létrejött kettős fertőzés demonstrálható-e sebészileg eltávolított carotis plakkokban, PCR és immunhisztokémiai módszerek segítségével. A betegek kettős fertőzését a két patogén ellen jelenlévő ellenanyagok szerológiai módszerekkel (*C. pneumoniae*-microimmunofluoreszcencia, HCMV-ELISA) történő kimutatásával állapítottuk meg. A betegekből nyert 22 carotis minta közül 5 minta mindkét patogénre negatív volt, 6 minta tartalmazott csak *C. pneumoniae* DNS-t (*C. pneumoniae* major outer membran [MOMP]-specifikus primerek használatával) és *C. pneumoniae* antigéneket (MOMP-specifikus monoklonális ellenanyag segítségével), 4 minta tartalmazott csak HCMV DNS-t (HCMV immediate early gén-specifikus primerekkel) és antigéneket (HCMV-pp65-specifikus monoklonális ellenanyaggal), és 7 minta pozitívnak bizonyult mindkét patogénra. A két patogén egymáshatásának lehetséges mechanizmusát az U937 human monocyta eredetű sejtvonal segítségével vizsgáltuk. Az U937 sejteket vagy HCMV-vel, vagy *C. pneumoniae*-val vagy mindkét patogénnel fertőztük és 6 olyan gazda gén mRNS kifejeződését mértük kvantitatív real time PCR-el, amelyek az atherosclerosis kialakulásával kapcsolatban lehetnek. Kontrollként mock-preparatummal fertőzött sejteket használtunk. A csak *C. pneumoniae*-val fertőzött U937 sejteken az IL-1béta, MCP-1, MMP-10, a pro-platelet basic protein (PPBP) és TNF-alfa gének fokozott kifejeződése jött létre. A HCMV-vel fertőzött sejteken az IL-1béta, TNF-alfa és a fatty acid binding protein-4 (FABP-4) gének kifejeződésének enyhe emelkedését mértük. A kettősen fertőzött sejteken a PPBP és FABP-4 kifejeződés 3.4-szer ill. 2.1-szer magasabb volt, mint az egy patogénnel fertőzött sejtekben. Mind a PPBP, mind a FABP-4 gént fontosnak tartják az atherosclerotikus plakkok, thrombosis és gyulladásos folyamatok kialakulásában. Ugyancsak fontos eredményünk, hogy a proatherogén sejt gének kifejeződését a *C. pneumoniae* fertőzés erősebben stimulálja, mint a HCMV fertőzés (Virók D. et al, Acta Microbiol. Immunol. Hung. 2006, 53:35-50).

A HCMV és DC kapcsolatát vizsgáltuk. Kérdésünk volt, hogy a HCMV Oslo törzse, amely in vitro passage-n csak 10 alkalommal ment keresztül, tehát nem laboratóriumban éveken át fenntartott, genetikai állományában megváltozott, laboratóriumi törzs, a./ szaporodik-e a DC-ben, b./ a HCMV, vagy a HCMV által termelt faktorok (növekedési faktorok, cytokinek, stb) befolyásolják-e a DC érési folyamatát, c./ a HCMV által termelt faktorok megváltoztatják-e a DCs funkcióit, elsősorban az antigén prezentáló funkcióját, specifikusan a *C. pneumoniae* antigéneket bemutató funkcióját.

Egészséges véradók perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) Ficoll-Paque denzitás grádiens centrifugálással nyertük, majd a monocyta frakcióból az adherens módszerrel, rhGM-CSF és rhIL-4 kezeléssel, állítottuk elő a DC populációt. A használt HCMV törzs (Oslo törzs) csak 10 alkalommal ment in vitro passzagon keresztül.

Eredményeink szerint a HCMV-Oslo törzs nem szaporodott a DC-ben, még a legkorábban expresszálódó HCMV igen korai antigének sem voltak kimutathatóak a fertőzött DC-ben. Azonban a human fibroblaszt sejtekről nyert HCMV inokulum a DC érési folyamatát stimulálta, azaz az érésre jellemző DC felszíni molekulák (CD40, CD83, CD86 és HLA-DR) kifejeződés lényegesen nagyobb százalékban volt jelen a HCMV inokulummal kezelt sejtek populációjában, mint a kontroll sejtekben. Érdekes eredményünk, hogy az érési folyamat stimulációjához nem volt szükség a HCMV partikulákra, ugyanis az ultracentrifugált HCMV preparátum felülúszója, amely nem tartalmazott kimutatható számban infektív viruspartikulákat, előidézte a DC érését. Eredményeink szerint a human fibroblaszt sejtekről a HCMV fertőzés után korán (24 óra), vagy későn (7-9 nap) nyert viruspartikula mentes felülúszó előidézte a DC érését. A HCMV felülúszóval kezelt DC funkcionálisan érett volt, azaz a rendszerhez adott *C. pneumoniae* antigéneket prezentálta a CD4+ és CD8+ lymphocyták felé, amelyet lymphocyta proliferációs módszerrel és a lymphocyták IFN-gamma termelésével mértünk (Kis Z et al, Arch. Virol. 2006, 151:2277-2287).

A *C. pneumoniae* és DC kapcsolatát vizsgáltuk. A DC kultúrák készítése az előbbieket szerint történt. A *C. pneumoniae* fertőzést követően, a DC 90%-ban, a sejtek cytoplazmájában a bakteriális antigének igen hosszú ideig jelen voltak, azaz végig a vizsgált 4 hetes periódus alatt. Infektív

baktérium termelést azonban nem tudunk mérni a fertőzött DC fertőzésre fogékony HEp2 sejtekre történt inokulálásával. Ezek az eredmények azt jelentik, hogy aktiv replikáció nélkül a *C. pneumoniae* antigének hosszú ideig perzisztálnak a sejtekben krónikus ingert jelentve az immunrendszer részére. A *C. pneumoniae* fertőzés azonban a DC érését fokozta, azaz a CD86, Cd83, CD11c és HLA-DR molekulák felszíni kifejeződése szignifikánsan több sejtben volt kimutatható. A fertőzött DC funkcionálisan is érett volt, a *C. pneumoniae* antigéneket prezentálta a CD4+ és DC8+ limfociták felé és azok IFN-gamma termelését fokozta. Érdekes kérdés volt, hogy a fertőzött DC-ben milyen *C. pneumoniae* gének transzkripciója történik meg és mely gének transzkripciója gátolt, amely a fertőző baktériumok kialakulásának gátlásáért is felelős lehet. A 16S rRNS gén, a groEL-1 és omcB gének kifejeződését mérni lehetett quantitativ real-time PCR módszerrel, azonban a bakteriális sejtosztódásban szerepet játszó ftsK gén expresszióját nem tudtuk kimutatni. Ez okozója lehet az infektív baktérium termelődés gátlásának. Tanulmányoztuk azt a lehetőséget, hogy a gátlás oka a DC kultúrák által termelt IFN-gamma jelenléte, amelyről leírták, hogy gátolja baktérium szaporodását és perzisztens baktérium hordozást alakít ki. Valóban, gátló koncentrációban jelen lévő IFN-gamma-t mutattunk ki a DC kultúrák felülúszójában, amelyet a nagy részben a szennyezésként jelen lévő limfociták termeltek, azonban, igen érdekes volt, hogy DC felszíni markerrel jellemezhető sejtek is termeltek IFN-gammát. A DC kultúrákhoz adott anti-IFN-gamma neutralizálta a felülúszóban jelenlévő IFN-gamma aktivitását, de nem befolyásolta a DC képtelenségét a fertőző baktériumok termelésére. A baktérium szaporodás gátlásáért tehát elsősorban nem termelődött IFN-gamma felelős (Kis Z. et al., FEMS Immunol Med Microbiol 2008, 52:1-11).

Krónikus *C. pneumoniae* fertőzés lefolyását vizsgáltuk in vivo, egér modell segítségével. BALB/c egereket ismételten fertőztünk intranasálisan *C. pneumoniae*-val és a baktérium replikációt (baktérium tenyésztéssel és PCR módszerrel a tüdőben és vérben), a humorális immunválasz lefolyását (*C. pneumoniae* specifikus IgM, IgG1, IgG2a, IgA és chlamydiális HSP60 ellenanyag termelést ELISA-val), celluláris immunválasz kialakulását (lépsejtek IFN-gamma termelésének mérésével ELISPOT módszerrel) és gyulladásra jellemző markerek (histamin, IFN-gamma és IL-6 ELISA-val) kialakulását követtük egy éven keresztül. Mind egyetlen, mind ismételt fertőzés után az egerek egy részében a vizsgált 1 éves periódus alatt a tüdőben vagy vérben kimutatható volt *C. pneumoniae* DNS, ami a baktérium perzisztenciára való hajlamát támasztja alá. Histamin volt kimutatható mind az első, mind az ismételt fertőzések után a tüdőben. Az antitestek jelenléte és celluláris immunválasz kimutatható volt az első fertőzés után, de az antitest titerek emelkedtek az ismételt fertőzések után. A baktérium szaporodás lezajlott a második és harmadik fertőzés után is, bár csökkent mértékben, ami azt jelenti, hogy új fertőzés létrejön immun-szervezetben is (Kis Z et al, Inflamm Res, 2008, 57:1-9).

2. A krónikus fertőzések és genetikai faktorok kapcsolatát kerestük az akut ischémias stroke kialakulásában.

A konvencionális rizikó faktorok nem magyarázzák meg teljesen az akut ischémias stroke kialakulásának mechanizmusát. A krónikus fertőzéseket okozó patogének közül a *C. pneumoniae*, HCMV, herpes simplex virus-1 típusa (HSV-1), varicella-zoster vírus, *Helicobacter pylori* kerültek a vizsgálatok középpontjába. Azonban más, perzisztenciát kialakító patogének is okozhatják az endotheliális sejtek károsodásához, amelynek a stroke kialakulásában szerepe lehet.

A gazdasejtek bizonyos génjeinek, pl. az IL-8, CD14, IL-6, P-selectin és cathepsin G, genetikai variációi ugyancsak hozzájárulhatnak a különböző antigén ingerekkel kiváltott gyulladás fokozásához és a stroke kialakulásához. A kemokinek családjába tartozó IL-8 mediálja az immunsejtek migrációját az endothelen keresztül, így az IL-8 fokozott termelődése plakk ruptúrát okozhat. Az IL-8 promotor polimorfizmus és a stroke kialakulás közötti összefüggést nem vizsgálták korábban. A CD14 egy monocita receptor és a promotor nt -260 C→T variációját

kapcsolatba hozták az érrendszer betegségeivel. Az eddigi vizsgálatok során a rizikó faktorok közül egyet-egyét, vagy csak néhányat tanulmányoztak a választott, rendszerint korban, a betegség után eltelt időben vagy a kísérő betegségek szempontjából heterogén beteganyagon. A mi vizsgálatunk a klasszikus rizikó faktorokat, több pathogén által kiváltott immunválaszt és az IL-8 és CD14 promoter polimorfizmusok jelenlétét együttesen vizsgálta egy relative homogén beteganyagon. A beteganyag kiválasztásának kritériumai a következők voltak: a./ első, nem kardiológiai eredetű ischémiás stroke, b./ a stroke kezelése a Szegedi Egyetem Neurológiai Klinikáján, c./ a beteg klinikára szállítása a betegség első 72 órájában, d./ 65 évesnél fiatalabb betegek.

Vérmintát nyertünk 59 stroke beteg és 52 kontroll egyénből. A klasszikus rizikó faktorokat a klinikai laboratórium vizsgálta. A *C. pneumoniae*-, HCMV-DNA és enterovirus-RNA jelenlétét a vérmintákban nested PCR –el vizsgáltuk. A *C. pneumoniae*, HCMV, HSV-1, HHV6 és EBV ellenanyag izotípusok (IgG, IgM, IgA) szintjét ELISA-val mértük. Ugyancsak ELISA-val határoztuk meg a vérsavó IL-8 szintjét. Az IL-8 és CD14 gének promoter polimorfizmusát PCR-el határoztuk meg.

A klasszikus rizikó faktorok közül szignifikáns összefüggés volt mérhető a stroke betegség és a rendszeres alkohol fogyasztás, a hiperlipidémia és magas vérnyomás között. A krónikus fertőzések közül nem volt összefüggés a stroke és a vérből kimutatható pathogén DNA jelenléte között. Nem volt összefüggés a stroke és a *C. pneumoniae*- IgG, IgA, IgM, a HHV6- és EBV- IgG, HCMV-IgM ellenanyag szintek között. Nem volt összefüggés a stroke és 3 vagy 3-nál több pathogénnel történt fertőződés (pathogén burden) között. Nem volt összefüggés a stroke és az IL-8 és CD14 promoter polimorfizmusok között. Azonban a krónikus fertőzések közül szignifikáns összefüggés volt a stroke és a HCMV-IgG ($p=0.015$) és HSV-1 IgA ($p=0.006$) izotípusba tartozó ellenanyagok jelenléte között. Ez az összefüggés erősen szignifikáns maradt logisztikus regresszióval végzett és az életkorra, nemre, dohányzásra, alkohol fogyasztásra, lipid szintre és magas vérnyomásra adjusztált statisztikai analízis után is.

Ezek az eredmények azt jelentik, hogy bizonyos fertőzések kapcsolatban lehetnek a stroke kialakulásával. Azonban nagyszámú, a stroke subtípusa szerint és életkor szerint csoportosított beteganyagon történő további vizsgálatok szükségesek. A kontroll csoport összeállítása nagy gondosságot igényel a vasculáris betegségek elterjedtsége miatt (Kis Z et al., *New Microbiologica*, 2007, 30:213-220).

3. A krónikus fertőzések és gyulladási markerek szerepét és változását vizsgáltuk percután transzlumináris coronária angioplasztikai beavatkozás (PTCA) után.

A coronária artéria betegségek egyik kezelési eljárása a PTCA beavatkozás. A PTCA beavatkozás az artéria lumenének megnagyobbítását eredményezi, azonban a PTCA után restenosis gyakran létrejön, amely ismételt beavatkozást igényel. A HCMV a populáció nagy részét megfertőzi és látens állapotban perzisztál a fertőzött szervezetben. A látens vírushordozás helyéül a monocyták és dendritikus sejtek prekursor sejtjeit tartják. A *C. pneumoniae* szintén kialakít krónikus fertőzéseket, a perzisztencia sejtjei valószínűleg monocyták, makrofágok, simaizom és endothel sejtek. Más pathogének is jelen lehetnek látens/perzisztens formában ezen sejtekben. Az atherosclerotikus plakkok predilektív helyein, és az atherosclerotikus plakkokban monocyták, dendritikus sejtek, ezek prekursor sejtjei, makrofágok, simaizom és endothel sejtek halmozottan fordulnak elő.

A hisztamin a gyulladási folyamatok résztvevője. Az u.n. indukálható hisztamin a hisztidin dekarboxiláz (HDC) enzim segítségével az L-hisztidinből keletkezik. Korábban leírtuk, hogy *C. pneumoniae* fertőzés hatására fokozott HDC képződés jön létre az egér bronchusok epitheliális sejtjeiben (Burian K. et al., *Immunol Letters*, 2003, 89:229-36). A C-reaktív protein (CRP) szint fertőzésekben és gyulladási folyamatokban emelkedik és jelzője ezen folyamatoknak. Az IL-6 atherogen szerepét leírták. A human heat shock protein 60 (hHSP60) szorongásos folyamatok kísérője és erős kereszt reaktivitást mutat a bakteriális, így a *C. pneumoniae* cHSP65 komponensével.

PTCA beavatkozáson átesett 28 betegről vérmintákat vettünk a PTCA beavatkozás előtt, és a beavatkozás után 4 és 14 nappal. Azt vizsgáltuk, hogy a beavatkozás elindítja-e a látens/perzisztens HCMV, C. pneumoniae, HSV vagy EBV reaktivációját a plakkok sejtjeiben, és a reaktiváció kapcsolatban van-e a vérsavóban lévő hisztamin, CRP, IL-6 és hHSP60 szintekkel. A HCMV és C. pneumoniae reaktivációt nested PCR-el (vírus/baktérium DNA), a HCMV, C. pneumoniae, bakteriális HSP65, HSV, EBV reaktivációt ELISA-val (ellenanyag) mértük. A hisztamin, CRP, hHSP és IL-6 szinteket szintén ELISA-val határoztuk meg.

Eredményeink szerint a HCMV- DNA 1 vérmintában volt jelen a PTCA előtt és 5 vérmintában a beavatkozás után. C. pneumoniae-DNA ugyancsak 1 mintában volt kimutatható PTCA előtt és 3 mintában a beavatkozás után. A beavatkozás előtti és utáni HCMV-DNA-re vagy C. pneumoniae-DNA-ra vonatkozó kimutathatóság közötti különbség nem volt szignifikáns. Azonban ha a két patogén DNA kimutathatóságának adatait összesítve tekintjük (2 minta pozitív a beavatkozás előtt vs 8 minta pozitív a beavatkozás után), akkor a kimutathatóság szignifikáns ($p=0.046$, logisztikus regresszióval számolva és adjusztálva a betegek életkorára, nemére és már előzőleg lezajlott PTCA beavatkozásra). A vizsgált patogénekre specifikus ellenanyag szintek nem változtak a beavatkozás után. Azonban a PTCA előtti hisztamin szint és C. pneumoniae IgA ellenanyag szintek között szignifikáns összefüggés volt mérhető ($p=0.021$).

A HCMV vagy C. pneumoniae DNA PTCA utáni vagy előtti kimutathatósága nem volt összefüggésben a később kialakuló restenozis esetekkel, a beavatkozás után 8 hónapig tartó megfigyelés alatt.

A hisztamin, CRP és IL-6 szintek erősen emelkedtek a beavatkozás után (logisztikus regresszióval és adjusztálva az életkorra, nemre és korábbi PTCA beavatkozásra, hisztamin $p=0.024$, CRP $p=0.002$, IL-6 $p=0.042$). Az anti-hHSP60 szint nem változott. A hisztamin, CRP és IL-6 szintek emelkedése nem volt összefüggésben a HCMV és C. pneumoniae DNA kimutathatóság emelkedésével.

Eredményeink alapján nagyobb számú beteganyag hasonló vizsgálatát érdemesnek tartjuk, amely vizsgálat a restenozis rizikójának korai felismerését eredményezheti (Petrovay F. et al., Inflamm Res. 2007, 56:362-367).