

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Klinikai és kísérletes vizsgálatok perzisztens fertőzésekhez társuló
kórfolyamatokban

Dr. Kónya József

Debrecen, 2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
Bevezetés	5
Humán papillomavírusok (HPV) és a cervikális karcinogenezis	9
Humán papillomavírusok szerkezete, szaporodása, osztályozása	9
Humán papillomavírusok előfordulása emberi megbetegedésekben	15
Bétaherpesvírusok, gammaherpesvírusok és a <i>periodontitis apicalis chronica</i>	23
A herpeszvírusok általános jellemzése és osztályozása	23
Humán cytomegalovírus	25
Humán herpesvírus 6	27
Epstein-Barr vírus	28
Az apikális <i>periodontium</i> gyulladásos kórfolyamatai	34
Bétaherpesvírusok, gammaherpesvírusok szerepe szájüregi kórképekben	37
A morbillivírus és az <i>otosclerosis</i>	39
Morbillivírus	39
<i>Otosclerosis</i>	40
Célkitűzések.....	42
Vizsgálati módszerek.....	43
Eredmények és megbeszélés	46
Humán papillomavírusok (HPV) tipizálása	46
Humán papillomavírus (HPV) kimutatás és tipizálás jelentősége a méhnyakszűrésben	54
Humán papillomavírus (HPV) kimutatás prognosztikai jelentősége méhnyaki léziók sebészi eltávolítása után.....	67
A cervikális karcinogenezist befolyásoló védekező mechanizmusok vizsgálata	70
HLA-II allélek kockázati szerepe a cervikális karcinogenezisben.....	70
Interleukin (IL)-10 nt-1082(rs1800896) nukleotid polimorfizmusának (A/G) kofaktor szerepe a cervikális karcinogenezisben	75
Epigenetikai szabályzó mechanizmusok vizsgálata a cervikális karcinogenezisben	79
Az IL-10 gén expressziós inaktivitása és a promoter CpG metilációja epiteliális eredetű normál és tumor eredetű sejtekben	79
CpG metiláció a humán papillomavírus genomban	86
Humán papillomavírus (HPV)-16 E7 onkoprotein aktiváló hatása Src non-receptor tirozin kinázokra	94
Humán herpesvírusok előfordulása <i>periodontitis apicalis</i> ban.....	99
Citokin mRNS expresszió <i>periodontitis apicalis</i> ban	104

Morbillivírus kimutatása <i>ankyloiticus stapes</i> talpmintákból	108
TNF-alfa mRNS expresszió és a morbillivírus <i>stapes ankylosis</i> ban	111
Összefoglalás és új eredmények	114
Irodalomjegyzék	116
Publikációk	136
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	136
Egyéb idegennyelvű közlemények	138
Scientometria	143

Rövidítések

AGC	atípusos mirigyhám sejtek (atypical glandular cells)
AIS	adenocarcinoma in situ
ASC	atípusos laphámsejtek (atypical squamous cells)
CDK	ciklin dependens kináz
CI _{95%}	95%-os megbízhatósági tartomány (konfidencia intervallum)
CIN	<i>cervicalis intraepithelialis neoplasia</i>
CIS	<i>carcinoma in situ</i>
DNMT	DNS-metiltranszferáz
E	„early”-korai
EBER	EBV által kódolt RNS
EBNA	EBV nukleáris antigén
EBV	Epstein-Barr vírus
EV	<i>epidermodysplasia verucciformis</i>
H3	hiszton 3
H4	hiszton 4
HCMV	humán cytomegalovírus
HDAC	hiszton deacetiláz
HHV-6	humán herpesvírus 6
HLA	humán leukocita antigén
HPV	humán papillomavírus
HSIL	„high grade squamous intraepithelial lesion”
IE	„immediate early”-azonnali korai
IFN	interferon
IL	interleukin
kb	kilobázis
L	„late”-késői
LCR	szabályozó régió (long control region)
LMP	látens membrán protein
LSIL	„low grade squamous intraepithelial lesion”
MHC	major hisztokompatibilitási komplex
NK	„natural killer cells”-természetes ölüsejtek
nt	nukleotid
OR	esélyhányados (odds ratio)
PBMC	perifériás vérből izolált mononukleáris sejt
PCR	polimeráz láncreakció
RR	relatív kockázat (relative risk)
RFLP	restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
TCR	T-sejt receptor komplex
TGF	tumor nekrosisz faktor
Th	helper T-limfocita
TNF	transzformáló növekedési faktor
Treg	regulátor T-limfocita
VLP	vírusszerű partikula

Bevezetés

A fertőzések és a következményes megbetegedések olyan küzdelemnek a megnyilvánulásai, amely a gazdaszervezet erőforrásaiért folyik az egyed (egyén) szervezete és valamilyen egyszerű biológiai szerveződésű mikroorganizmus populáció között. Ennek a kompetitív kölcsönhatásnak a létrejötte valószínűségi esemény. A kölcsönhatás ökológiai szempontból instabil, dinamikusan változó, ami alapvető hatással van a kölcsönhatás időbeni alakulására, lefolyására. Az ökológiai szabályszerűségek tökéletesen tükröződnek az alapvető infektológiai megfigyelésekben. A fertőzések többsége **akut** módon zajlik le és a gazdaszervezet-kórokozó kapcsolat teljes megszűnésével ér véget, a gazdaszervezet vagy eradikálja a kórokozót vagy elpusztul tőle.

Minden gazdaszervezetnek vannak olyan kórokozói, amelyek **perzisztens fertőzéseket** képesek kialakítani. A kórokozónak ez a képessége evolúciós adaptálódással fejlődött, szelektálódott ki. A perzisztens fertőzést okozó kórokozók számára szelekciós előnyt jelent, hogy a kórokozó fennmaradása sokkal kevésbé függ a fertőzés sikeres átvitelétől további fogékony egyénekre, mint az akutan fertőző kórokozók esetében. A perzisztálás akkor áll fenn hosszú ideig, ha a gazdaszervezet károsodása csak olyan mértékű, hogy a gazdaszervezet a saját biológiai funkcióit el tudja látni. Az elhúzódó, larvált lefolyásnak a veszélye éppen abban rejlik, hogy a szervezeti károsodások kumulálódhatnak, ami megbetegedés lassú, de biztos progressziójával jár együtt. Mire a progrediáló folyamatok eredményeképpen a megbetegedés teljesen manifesztálódik, a szervezet tartalékai, kompenzáló és kontrolláló mechanizmusai már rendszerint kimerülnek, ami a sikeres orvosi kezelés esélyét erősen csökkenti.

A kórokozó szaporodási tendenciája alapján a perzisztens fertőzés lehet **krónikus** lefolyású, lehet **látens** fertőzés időnkénti reaktivációval vagy lehet lassúvírus **fertőzés**. A **krónikussá** váló fertőzés rendszerint akutan kezdődik, kórokozó szaporodása előbb felfut, majd a szervezeti védekezés és a belső környezetből fakadó korlátok miatt csökkenni kezd, de a szervezet nem képes teljesen eradikálni a kórokozót. A szervezet és a kórokozó között patológiás egyensúlyi állapot jön létre, a kórokozó szaporodása hosszú távon mérsékelten egyenletes vagy enyhén fokozódó. A gazdaszervezet sorsa attól függ, hogy milyen mértékig és mennyi ideig képes kompenzálni a kórokozó szaporodásából eredő károsodásokat. A **látens** fertőzés is az akut szakasz után szokott kialakulni, a kórokozó itt sem tűnik el a szervezetből, hanem inaktív állapotban megbújik arra alkalmas sejtben vagy képletben, a mikroorganizmus szaporodása leáll. Amíg inaktív állapotban van, nem okoz további károsodást, azaz látens állapotban a fertőzés nem befolyásolja a szervezet egészségi állapotát. A *látens fertőzés reaktivációja* valószínűségi esemény, amely részben a kórokozó saját minőségi és mennyiségi tulajdonságaiból adódik, részben olyan, a kórokozótól független körülmények határozzák meg, mint a gazdaszervezet általános állapota, immunstátusza, társfertőzések jelenléte. A reaktiválódott fertőzés lefolyás szempontjából akut fellángolásnak felel meg, amely után a fertőzés ismét inaktív állapotba kerül. A **lassúvírus** fertőzést a kórokozó és az általa okozott degeneratív károsodások alattomos,

monoton mennyiségi növekedése jellemzi. A szervezet sem a védekezés, sem a szöveti károsodás szintjén hosszú ideig, jellemzően évekig nem észleli a lassú fertőzést. Mire a biztos progresszió betegségben nyilvánul meg, alig-alig marad terápiás vagy palliatív eszköz az orvostudomány kezében.

Kórokozó szerep, kórfolyamati (patogenetikai) szerep

A mikroorganizmusokat azért szükséges humán kórokozó szerep szerinti jellemezni, mert az élő környezetünk mikroorganizmusai és az emberi szervezet közötti kapcsolat nemcsak kórokozás, azaz ökológiai szempontból parazitizmus lehet, hanem kommenzalizmus és mutualizmus is. Az utóbbi két, szervezetünkre közömbös vagy akár előnyös kölcsönhatás a szervezet rezidens mikroflórája, a mikrobiota részéről valósul meg. A kórokozó és mikroflóra kategóriák nem fedik le az összes lehetséges viszonyunkat a mikroorganizmusokkal. A tranziens módon olyan mikroorganizmusok is kolonizálhatnak a szervezetben, amelyek nem emberhez adaptálódtak és ezért tartósan nem is képesek megmaradni az emberi szervezetben. Az opportunisták kifejezett, egészséges gazdaszervezetet nem képesek megbetegíteni, de általános legyengülésben vagy a védekező mechanizmusok sérülése mellett már károsíthatják a gazdaszervezetet.

A mindennapi orvosi gyakorlatban természetesnek vesszük, hogy adott betegből kimutatott, jól ismert mikroorganizmust a betegség kórokozójának tekintünk. Az egyes fertőző betegségek kórokozójának ismerete mögött korábbi tudományos igényű megfigyelések, elemzések állnak. Mikroorganizmusok **kórokozó szerepének** első formális igazolása Robert Koch nevéhez fűződik. Az általa felállított feltételrendszert tiszteletére *Koch posztulátumok*ként emlegetik. A klasszikus *Koch posztulátumok* akkor érvényesülnek, ha a fertőző betegségben szenvedőkből jól definiálható mikroorganizmus taxon izolálható, az izolátumok fogékony állatmodellben kiváltják a fertőző betegséget és a megbetegedett állatokból ugyanúgy és ugyanazon taxonba tartozó mikroorganizmusokat lehet visszaizolálni.

A klasszikus *Koch posztulátumok* vizsgálatát a mikroorganizmusok több tulajdonsága is akadályozhatja. Tenyésztéssel nem vagy nehezen izolálható mikroorganizmus esetében ugyanúgy nem alkalmazható, mint fogékony állatmodell hiányában. A perzisztens fertőzésekből a korlátozott vagy ideiglenesen szünetelő szaporodás miatt még az egyébként igénytelen mikroorganizmusok is nehezebben izolálhatók. Fogékony állatmodellben végezhető vizsgálatra még kisebb az esély, mivel a perzisztens fertőzésekre jellemző patológiás gazda-kórokozó egyensúlyt fenntartó mechanizmusok más gazdafajban más összetételben várhatók, ami a folyamat más kimenetelét eredményezi.

A mikroorganizmus teljes egészében történő izolálásával majdnem egyenértékű a mikroorganizmus egyes esszenciális komponenseinek kimutatása. A fogékony állatmodell helyett közelítő megoldást jelentenek a jól kontrollált klinikai megfigyelések, nyomon követések. A mikroorganizmusok jellegzetes esszenciális alkotórészeinek a kimutatása különböző molekuláris vizsgálati eljárásokkal végezhető. Ezen vizsgálati módszerek széles körű elterjedése lehetővé tette a *molekuláris Koch posztulátumok*ként elnevezett feltételrendszer megalkotását [1].

1. *A mikroorganizmus halmazódása megbetegedettekben.* Ideális esetben a kórokozó vagy egyedi antigénje, nukleinsav szekvenciája a megbetegedettekben kimutatható, míg az egészséges populációban nem. A gyakorlatban a megbetegedettekben és az egészségesekben megfigyelt prevalencia (előfordulási arány) szokott lényegesen különbözni, azaz a fertőzést populációs szinten mennyiségi adatokkal jellemezhetjük. Az ilyen adatok biológiai és orvosbiológiai jelentősége epidemiológiai módszerekkel jellemezhető. Az epidemiológiai tanulmány típusától függően az összefüggés erősségét relatív kockázattal vagy esélyhányadossal fejezik ki. A mikroorganizmus és a betegség kapcsolatára utalhat az is, ha a beteg szervezetben a vizsgált mikroorganizmus lényegesen nagyobb mennyiségben mutatható ki, mint az egészségesekben. Az utóbbi esetben a mikroorganizmus *dőzishatásának* kimutatása történik. A jelen pontban kifejtettek értelemszerűen akkor is alkalmazhatók, ha multifaktoriális megbetegedés lefolyásában az adott mikroorganizmus kofaktor szerepet tölt be.
2. *A mikroorganizmus és a megbetegedés időbeli viszonya.* Az 1. pontban vázolt kapcsolat a betegség és kórokozó között még nem ad választ arra, hogy a valós kóroki tényezőt azonosítottuk vagy a betegség hajlamosít a vizsgált fertőzésre vagy a kettő között nem közvetlen kapcsolat van, hanem egy közös, még általunk nem ismert harmadik tényező segíti elő mind a betegség, mind a fertőzés kialakulását. A kóroki szerep időbeni feltétele teljesül, ha a jelenleg egészséges populációban a kórokozó vagy egyedi antigénje, nukleinsav szekvenciája alapján meg lehet jósolni, hogy kik vannak kitéve fokozott betegségkockázatnak a jövőben.
3. *Reverzibilitás.* A gyógyulás vagy eredményes terápia után a mikroorganizmus prevalenciája vagy a fertőző csíraszám (vírusoknál kópiaszám) lényegesen csökken. Szintén a reverzibilitást támasztja alá, amikor a kórokozó eliminálása után a populációban a megbetegedés incidenciája lényegesen csökken. A reverzibilitási feltételt elsősorban az elsődleges kóroki tényező vonatkozásában lehet vizsgálni.
4. *Plauzibilitás.* Viszonylag tág értelemben megfogalmazott feltételek tartoznak ide, értékelésük pedig a tudomány aktuális állása szerint történik: A mikroorganizmus filogenetikai helye és filogenetikailag közel álló fajok biológiai tulajdonságai alapján értelmezhető-e a kórfolyamat? A mikroorganizmus ellenes immunválasz összhangban van-e a betegség lefolyásával? A kórfolyamatra jellemző sejt-, szövet-, szervkárosodás kulcslépéseit kísérletes körülmények között elő lehet-e idézni a feltételezett kórokozóval vagy annak egyes termékeivel, összetevőivel?
5. *A következtetések reprodukálhatósága és általános érvénye.* A 1.-3. pontokban vázolt feltételek teljesülését epidemiológiai analízissel lehet igazolni. A levont következtetések helytállóságának előfeltétele az epidemiológiai tanulmány belső és külső validitása [2]. Az előbbi arra utal, hogy az általunk vizsgált jelenségre nézve mennyire megbízhatók és reprodukálhatók a következtetések, hasonló körülmények között ismételve hasonló eredményre jutnánk-e. A külső validitás arra a kérdésre keresi a választ, hogy a levont következtetések érvényesek-e szélesebb populációkra is. Az eredmények megbízhatóságát az epidemiológiai mintavétel, a véletlen szerepe, a torzítások és a zavaró

hatások befolyásolhatják. A véletlen szerepét a statisztikai szignifikancia vizsgálatával becsüljük meg. A torzítást azaz a valóságtól tendenciaszerűen eltérő eredményeket a feltételezett kockázati tényezőket mérő, rögzítő módszerek, valamint az epidemiológiai és biológiai mintavétel megfelelő megválasztásával lehet minimalizálni. Zavaró hatást olyan tényezők okozhatnak, amelyek mind a vizsgált kockázati tényezőt, mind a bekövetkező eseményt (betegség) befolyásolják. A nem ellenőrzött vagy nem ismert zavaró tényezők hatása megnyilvánulhat akár valótlán összefüggés észlelésében akár – ellenkezőleg – valós összefüggés elfedésében. A lehetséges zavaró tényezők feltárásához nélkülözhetetlen eszköz a plauzibilitási feltételek alapos vizsgálata és a kórfolyamatot leíró hipotézis felállítása. A zavaró hatások kiszűrésére ma leginkább több változós statisztikai elemző eljárásokat alkalmaznak. A külső validitást azaz a következtetések általánosíthatóságát alátámasztja, ha eltérő helyen és időben, más személyek és körülmények között is *konzisztens* módon megfigyelhető az *összefüggés*. A nemzetközileg elfogadott, elvek szerint teljes populációkra alapozott epidemiológiai tanulmányoktól lehet elvárni az összefüggés általános érvényének bizonyítását. Az ilyen nagy léptékű, sok erőforrást igénylő epidemiológiai vizsgálatokat viszont csak konzisztens és plauzibilis összefüggésekre alapozva indokolt elindítani.

A jelen értekezésben olyan megbetegedések vizsgálatait írjuk le, amelyek kialakításában és patogenezisében perzisztens vírusfertőzések szerepe felmerült. A molekuláris Koch posztulátumok szempontrendszer szerint molekuláris epidemiológiai eszközökkel vizsgáltuk a humán papillomavírusokat a cervikális karcinogenezisben, humán herpesvírusokat a *periodontitis apicalis*ban és a morbillivírust az *otosclerosis*ban

Humán papillomavírusok (HPV) és a cervikális karcinogenezis

Humán papillomavírusok szerkezete, szaporodása, osztályozása

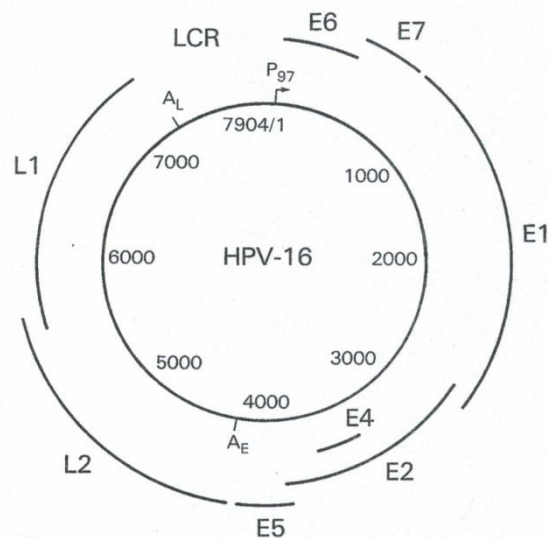
A bőrön található *verruca vulgaris* megjelenése, terjedése már régen is fertőző mikroorganizmus kórokozó szerepét vetette fel. A klasszikus virológiai módszerekkel (elektronmikroszkópia, ultracentrifugálás) vírust azonosítottak, amely papillomavírus elnevezést kapott az állatok papillomás elváltozásait okozó vírusokkal rokon tulajdonságai miatt.

A méhnyakrák előfordulásával kapcsolatban már a 20. század elején valószínűsítették, hogy szexuális kapcsolat közben terjedő kórokozó van a háttérben. Az 1970-es években Harald zur Hausen, aki 2008-ban a papillomavírusok onkogén szerepének a felismeréséért Nobel díjat kapott, felállította tudományos hipotézisét, mely szerint a genitális nyálkahártyákon kialakuló *condyloma acuminatum* anatómiai és szövettani hasonlósága a papillomás elváltozásokhoz, egyes exophytikus genitális tumorok *condylomákhoz* hasonló morfológiája, valamint a méhnyak korai premalignus elváltozásaiban megfigyelt egyes hámelváltozások hasonlósága a szemölcsszerű hámburjánzásokéhoz mind-mind papillomavirális rákkeltő szerepre utalnak.

A *condylomákból* sikeresen izoláltak vírus részecskéket [3], amelyeket genomjuk alapján akkoriban DNS hibridizációval tudtak azonosítani és restrikciós hasítási mintázattal tudták igazolni, hogy egy újabb papillomavírus típus van a háttérben. Invazív méhnyakrákból azonban vírusrészecskéket nem lehet izolálni, csak a DNS vizsgáló eljárások maradtak az akkor még ismeretlen papillomavírus típusok azonosítására. Mivel a DNS hibridizációs vizsgálatok nem elég egzaktak, az 1980-as években elterjedő DNS szekvenálással igazolták, hogy valóban előfordul teljes papillomavírus genom a tumorsejtekben [4], még hozzá egy újabb típusé, amely sorrendben 16-os számot kapta. Az újszerű eredmény sikere elindította papillomavírusok vizsgálatát méhnyakrák biopsziákban és sejtvonalakban is és 15 év alatt kb. 80-ra emelkedett a teljes szekvenciával azonosított papillomavírusok típusok száma. A 80-ból mintegy 20-at találtak meg *cervix carcinomában*. Azóta 180-on is túl van az azonosított humán papillomavírusok száma, azonban az anogenitális típusok száma nem nőtt számottevően.

A papillomavírusok megbízható kimutatását a PCR technika elterjedése hozta el. A nagyszámú típus lefedésére konszenzus PCR technikát fejlesztettek. Olyan konszenzus szakaszokat próbáltak azonosítani az oligonukleotid primer tervezésére, amelyeknek esélye volt az akkor még nem ismert papillomavírus típusok amplifikálására is. Ötletesen abból indultak ki, hogy a fehérjekódoló genetikai információban aminosav szinten kell keresni konzervatív szakaszokat, mert az a még ismeretlen típusokban is valószínűleg hasonló lesz. A vírus L1 major kapszid génjében sikerült két konzervatív oligonukleotid próba tervezésére alkalmas konszenzus szekvenciát (MY09, MY11) azonosítani [5], amelyek kis eltéréssel 450 bp szakaszt (ún. MY szakaszt) határolnak az anogenitális papillomavírusokban. Az MY szakaszban később további konszenzus lehetőségeket azonosítottak.

Az ezredfordulóra kristályosodott ki a detektálási technika olyan mértékben, hogy nagy multicentrikus, populációs epidemiológiai vizsgálatokban mérjék fel az egyes papillomavírusok előfordulását és onkológiai kockázatát.



1. ábra Humán papillomavírus 16 genomi térképe. P97: transzkripció promóter; E1-E7: korai fehérjék génjei; L1, L2: késői fehérjék génjei; AE és AL: korai és késői poliadenilációs szignál; LCR: nem kódoló, szabályozó régió (long control region) (Az ábrát Fields Virology 4th ed. 2001. kiadásából vettem át [6])

Humán papillomavírusok (HPV) szerkezete

Az embert és az állatokat fertőző papillomavírusokat a *Papillomaviridae* családba sorolják. A családra jellemző közös jegyek a mintegy 8 kb méretű kettősszalú, cirkuláris DNS genom, a burok nélküli ikozahedrális kapszid szerkezet. A DNS genomban a fehérjéket kódoló gének ugyanazon a szálon helyezkednek el, amelyet ezért pozitív szálnak is neveznek. A genomban három fő rész különböztethető meg: az LCR (long control region) szakaszban a vírus mRNS transzkripcióját szabályzó promóter szekvenciák találhatók meg és itt helyezkedik el a genom replikációs origója is, a korai régió („E”, early region) a genom replikációját és transzkripcióját szabályzó fehérjéket kódol, míg a késői régió („L”, late region) az L1 és L2 kapszidfehérjéket kódolja (1. ábra). A papillomavírus genomban sok más vírushoz hasonló módon a fehérje kódoló olvasási keretek átfedik egymást [7]. Az átfedő fehérjéket kódoló bázishármasok leolvasása kereteltolással valósul meg, a különböző fehérjékben már elsődleges szerkezetben, aminosav sorrend szintén sincs közös szakaszuk. A korai régió 6-8 fehérjét kódol, a különböző papillomavírusok homológ fehérjeit egységesen ugyanazon számmal jelölik. Ebből adódik, hogy a humán papillomavírusoknak E1, E2, E4, E5, E6 és E7 korai fehérjei vannak, nem található meg bennük a bovin papillomavírusok E3 és E8 leolvasási kereteinek homológ szekvenciái. A késői régió az L1 major kapszidfehérjét és L2 minor kapszidfehérjét kódolja.

A vírus kapszid 72 kapszomerből épül fel, minden kapszomert öt L1 és egy L2 molekula alkot [8]. Az L2 protein biztosítja az összeszerelődés alatt a kapcsolatot a DNS genommal, a virion külső felszínén az L1 fehérje dominál. Az L1 külső vírusfehérje minőségében látszólag ellentétes tulajdonságokkal rendelkezik: hordozza a típuspecifikus ellenanyag epitópokat, amelyek minden eddigi adat szerint egyediek a több száz papillomavírus típusban [9-12], de ugyanakkor a családon belül a legkonzervatívabb fehérje. Az utóbbi tulajdonságát a papillomavírusok taxonómiai besorolásánál alkalmazzák, egy újonnan azonosított papillomavírus szekvencia akkor tekinthető új típusnak, ha az L1 nukleotid szekvenciája kevesebb mint 90%-ban egyezik meg, több mint 10 %-ban eltér az eddig ismert típusokétól [13]. A típusokat sorszámmal jelölik, rövidítésben a HPV-1, HPV-16, stb. formátumot alkalmazzák általánosan. A konzervatív elsődleges szerkezet és az igen diverz ellenanyag epitóp kínálat háttérében az áll, hogy az utóbbi konformációs epitóp, a kapszid összeszerelődésével alakul ki [14], azaz negyedleges fehérjeszerkezetből adódik. A kapszid szétesése vagy célzott szétbontása után a domináns típuspecifikus epitóp is eltűnik [15].

Humán papillomavírusok (HPV) osztályozása

Az ismert papillomavírusok taxonómiai besorolása az L1 nukleotid szekvencia alapján történik. Eddig több mint 180 HPV típust azonosítottak [13] és kb. feleannyi különböző állati eredetű papillomavírust. A típusok közötti hasonlóság eltérő mértékű, a filogenetikai elemzés egymástól jól elkülöníthető csoportokat eredményez. Bármely két papillomavírus típus között legalább 10% nukleotid szekvencia különbség van. Azon típusokat, amelyek között 71-89% nukleotid homológia van, azonos fajba tartozónak tekintenek. Az azonos nemzetségbe sorolás feltétele a >60% szekvencia homológia [13, 16]. Az L1 gén a major kapszid proteint kódolja, és amely típusoknál eddig vizsgálták, ott egy-egy genotípus egy-egy önálló szerotípusnak felel meg. Ez alapján hivatalosan típusnak nevezik a fajon belüli taxonómiai egységet.

A családon belül a nemzetségeket a görög ABC betűivel jelzik, eddig 20-at különítettek el. A humán papillomavírusok 5 nemzetségben, *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Mu*- és *Nupapillomavirus* nemzetségekben találhatók. Kután típusok, azaz a bőr elszarusodó laphámját fertőző típusok négy nemzetségben is megtalálhatók. Érdekes módon a széles körben elterjedt, a közönséges szemölcsöt okozó HPV-1 másodmagával alkotja *Mupapillomavirus* *genust*, míg a *Nupapillomavirus* *genus*ba jelenleg csak az egyébként is ritkán előforduló HPV-41 mukozális típus tartozik. Az összes többi HPV típus egyenletesen oszlik meg a három nagy nemzetség között. Az *Alphapapillomavirus* *genus*ban mind kután, mind mukozálisan fertőző típusok megtalálhatók. Az itt előforduló 14 faj *Alphapapillomavirus*-1, -2, ...-14 nevezékforma szerint kapta a nevét. Ebben a nemzetségben lehet a legjobban megfigyelni, hogy a nukleotid homológia és a törzsfa szerint meghatározott fajok a biológiai szerep szerint szegregálódnak.

Humán papillomavírusok (HPV) szaporodása – permisszív fertőzés

A humán papillomavírusok a többrétegű hámokat fertőzik. Hagyományos úton sem primer, sem folyamatos sejtvonalakban nem oldható meg az *in vitro* vírusszaporítás. A háttérben a papillomavírusok sajátos replikációja áll. A sikeres szaporodáshoz a *stratum basale* réteget kell fertőzni, amelyhez feltételezhetően mikrosérüléseken keresztül nyílik meg az út [7, 17, 18]. A papillomavírusok tapadásához valószínűleg általánosan előforduló sejtfelszíni struktúrákon keresztül tapadnak a célsejthez [19-22]. A vírusneutralizációs vizsgálatokhoz kifejlesztett pszeudovírus rendszerek igazolták, hogy célsejtek széles körébe képes a HPV virion bejutni [23-25]. Azonban a legtöbb sejtben non-permisszív fertőzés alakul ki, a papillomavirális fehérjék nem vagy nem elég ideig fejeződnek ki ahhoz, hogy a sejtre gyakorolt hatásuk megfigyelhető legyen.

A HPV fertőzés természetes célsejtjei a többrétegű hámok bazális sejtjei, amelyek állandó osztódással pótolják a differenciálódó sejtek terminális veszteségét. Az állandóan osztódó sejtben a HPV genom a gazdasejtrel szinkronban osztódik, a szuprabazális sejtekben is fennmaradva. A HPV részéről ebben a stádiumban az E1 és kisebb részben az E2 fehérje köti a HPV genomot a gazdasejt DNS replikációjához. A továbbiakban a HPV replikációja szorosan kötődik a többrétegű hám differenciálódásához, a vírusreplikáció zömmel a *stratum spinosum* rétegben zajlik. Ezen a ponton kerül ellentétbe a vírus szaporodási stratégiája a gazdasejtével, mivel a gazdasejtnek ilyenkor már nem kell osztódnia, a differenciálódás során a DNS szintézis leáll. A HPV viszont csak aktív DNS szintézist folytató sejtben tud szaporodni, mivel a nukleotid trifoszfátok mellett még a teljes DNS szintetizáló rendszert is a gazdasejt részéről igényli. Ezen a szinten a humán papillomavírusok az E6, E7 és részben az E5 virális proteineken keresztül stimulálják a sejtciklust, olyan sejtekben, ahol már arra fiziológiásan nem lenne szükség, hanem inkább káros a gazdaszervezetre. Ezért már a papillomavírusok által okozott jóindulatú hámburjánzásokban, diszpláziás, azaz differenciálódásában megzavart sejtekre utaló szövettani elváltozások figyelhetők meg. A diszpláziás réteg jellemzően kiszélesedik, ami a makroszkóposan megjelenő hámburjánzás szövettani hátterét jelenti. Mindezt úgy kell megvalósítani a vírusnak, hogy közben a gazdasejt nem veszítse el végleg a differenciálódó képességét. Mind a vírus, mind a gazdaszervezet számára legszerencsésebb esetben a legfelső sejtrétegek eljutnak a terminális differenciáltság állapotába. Közben az E4 fehérje adjuváns hatására a felszaporodott vírusgenom kópiák és a frissen szintetizált L1 és L2 fehérjék összeépülnek az új virionokká. A terminálisan differenciált hámsejtek fiziológiás sorsa a fokozatos leválás, szétesés. Így szabadulnak ki belőlük az újonnan képződött virionok is. Összességében, a HPV szaporodási ciklusa teljes mértékben kapcsolódik a többrétegű laphámok differenciálódási folyamatához [26, 27].

A HPV szaporodás *in vitro* modelljét a rendkívül munka- és szakemberigényes organotipikus hámsejt kultúrákkal oldották meg. Kollagén alapú hordozó felszínre oltanak keratinocitákat. A hordozó úgy

van kialakítva, hogy felszíne a tápfolyadék-levegő határon legyen, a hordozóra oltott keratinociták ugyanúgy a bazális oldalról kapják a táplálást, mint természetes körülmények között. Osztódás után a külvilág felé szorult sejtek elkezdnek differenciálódni, majd az újabb osztódások hatására egyre magasabb rétegbe kerülni. Végül a természetes el nem szarusodó laphámokhoz hasonló rétegződés és differenciálódás alakul ki. Amikor olyan keratinocitát oltanak le, amely tartalmaz HPV genomot, akkor a HPV-k természetes szaporodásának lépéseit lehet tanulmányozni a rendszerben. Többek között a méhnyakrákot okozó HPV-16, HPV-18 és HPV-31 típusok organotipikus *in vitro* modelljét is létre hozták. Ugyan az organotipikus kultúrák infekzív HPV virion előállításra is alkalmasak, elsődleges felhasználásuk mégsem erre irányul, ugyanis csak extrém nagy arányban (>800 virion/célsejt) képesek hatékonyan fertőzni a jelenleg hozzáférhető rendszerekben [28]. A HPV genom bejuttatás még mindig hatékonyabb rekombináns rendszerek révén, akár olyan rendszerben (pl. Cre-loxP) is, amely biztosítja a bejutás után a hordozószekvenciáktól mentes HPV genom szeparálódását és a teljes szaporodási ciklus végbemenetelét. Az organotipikus kultúrák igazi alkalmazási területe jelenleg az egyes virális fehérjék alapfunkcióinak egzakt vizsgálata [29, 30].

Humán papillomavírusok transzformáló hatása a gazdasejtben

Az onkogén HPV típusok permisszív fertőzéséhez szükséges a sejtciklus indukálása az epiteliális gazdasejtben, ami a fertőzött sejtek egy részének kromatin állományában statisztikus módon instabilitást okoz. A változások mind a gazdasejt, mind a HPV örökítőanyagát érintik. Az onkogén HPV vírussal fertőzött hámsejt elveszti fiziológiás differenciálódó képességét, ami önmagában is a permisszív HPV fertőzés megszakadásához és a virionképződés megszűnéséhez vezet. A kromatinállomány instabilitása miatt kialakulnak olyan klónok, amelyek a sejtszaporodás szigorú szöveti szabályozása alól kibújva szelekciós előnyre tesznek szert. A HPV indukált diszpláziákban és neopláziákban a virális E6 és E7 onkogének jelenléte esszenciális a sejtciklus aktív tartásához. A diszpláziás vagy már neopláziás cervikális hámsejt autonóm növekedéséhez szükséges optimális virális onkogén expressziót a virális genomban kialakuló szomatikus genetikai és epigenetikai változások véletlenszerűen kialakuló kombinációja biztosítja. Összefoglalva, a *transzformáló HPV fertőzésben* a gazdasejt autonommá válik és sem eredeti szöveti funkcióját nem látja el, sem a permisszív vírus ciklus nem tud benne végigmenni.

A papillomavírusok E6 proteinje, az apoptózis felfüggesztésére specializálódott, a gazdasejt önvédelmét gátolja, amellyel a fokozott sejtciklusra programozott sejtelhalással tudna reagálni a gazdasejt. Az onkogén HPV típusok E6 fehérjéinek alapvető antiapoptotikus mechanizmusa a p53 tumorsuppresszor fehérje lebontása az ubiquitin-proteasóma útvonalon [31, 32]. A p53 fehérjén két olyan domén van, amelyekhez kötődve papillomavírusok befolyásolhatják a működését. A C-terminálisan található nukleáris lokalizációs szignál megkötésével a papillomavírusok E6 proteinje a

citoplazmában, a nukleáris targetektől elszeparálva tartja a p53 fehérjét [33]. Az ubiquitin-proteasóma útvonalon zajló lebontáshoz szükséges p53 core régió kötése viszont csak az onkogén HPV típusok E6 fehérjéi képesek [32].

Az E6 kötés akadályozza a p53 fiziológiás celluláris interakcióit. A hADA3 hiszton-acetiltranszferáz a p53 transzkripció komplex hiányában nem aktiválja a célgén transzkripció aktivitását. A CBP/p300 koaktivátor az E6-p53 komplexben nem képes acetilálni a p53 fehérjét, amelynek révén a p53 aktiváló transzkripció faktorként tudna viselkedni a célgén promoter szakaszán [34]. Az E6 fehérje-fehérje kötással további sejtciklust és apoptózist, valamint sejt differenciálódást, sejtadhéziót és DNS javító celluláris fehérjével képes kölcsönhatásba lépni. Közvetlen kötással és degradációval gátolni képes az apoptózisnak az intrinsic és extrinsic útvonalait, az előbbi a Bcl-2 családba tartozó BAX és BAK degradációjával, az utóbbit a TNF jelátviteli útvonal TNFR-1, FADD proapoptotikus fehérjék degradációjával. Az E6 számos kölcsönhatásban jelen van az E6AP, amely proliferáló sejtekben szabályoz számos jelátviteli utat fehérje-fehérje kölcsönhatások révén. Az E6-E6AP-célfehérje komplexekben az E6AP is degradálódik, funkcionális szintje lecsökken. Az E6AP-hez hasonlóan több celluláris fehérjének a nevében is szerepel, hogy az E6 célpontjaiként szolgálnak. Az E6TPI GTPáz aktivátor kiütésével a Rab útvonal szabadul fel a gátlás alól, az E6BP kalcium kötőfehérje funkcionális inaktiválásával a hámsejtek differenciálódása válik akadályozottá. A sejtadhézió és hámsejt polarizáció zavarát okozza a hDLG regulátor fehérje, a hScrib és MAGI-1/2/3 *tight junction* fehérjék megkötése és degradációja. A telomeráz katalitikus alegysége (hTERT) aktiválódik az E6-E6AP komplex hatására. Az E6 olyan DNS javító fehérjék lebontását fokozza, mint a XRCC1 és MGMT [32, 33, 35].

Az onkogén papillomavírusok E7 proteinje a sejtciklust aktiválja, elsődleges célpontjai az Rb fehérjék, amelyeket hipofoszforylált állapotban köt. Szabad Rb fehérjék hiányában az E2F transzkripció faktor az Rb gátlás alól felszabadulva aktiválja a sejtciklust [31]. Az E7 fehérje a p21 és p27 CDK inhibitorokat is képes megkötni, amelyek gátló hatásának kiesése miatt ciklin A ill. ciklin E kinázok működése fokozódik [36]. Az E6-hoz hasonlóan az E7 fehérje is fehérje-fehérje kölcsönhatások révén fejti ki a hatását. A megkötött fehérjék között vannak transzkripció faktorok ill. a kromatin működését biztosító fehérjék. Az előbbiekre közé tartozik az E2F6, amely a szabad E2F működést gátolná, az utóbbiak közé a HDAC-1 hisztondeacetiláz és a DNS javító ATM és claspin fehérjék [32, 33, 35].

Az E6 és E7 onkoproteinek hatására a sejtciklus fokozottan működik, miközben a kromatinban keletkező hibákra reagáló celluláris mechanizmusok kikapcsolódnak. A kromatin instabilitása mind a gazdasejt genomját, mind a virális genomot érintik. A vírusgenom statisztikus módon integrálódik valamely gazdasejt kromoszómába, az integrált állapot gyakran együtt jár a virális E2 kódoló szakasz deléciójával vagy felszakadásával (ui. ott nyílik fel a cirkuláris genom) és az E2 visszacsatolás kiesésével [37, 38]. Az utóbbi viszont az E6 és E7 onkoproteinek fokozott expressziójával jár. Ha

megfelelő az E2 expresszió, az LCR szomatikus mutációi, deléciói, amelyek érintik az E2 kötőhelyeket, még mindig megakadályozhatják az fiziológias szabályozást [39]. Ez utóbbi jelenség inkább az episzomális állapotú HPV-t hordozó neopláziás esetekben fordul elő, de néha az integrált HPV genomban is ilyen mechanizmussal sérül az E2 visszacsatolás.

A gazdasejtben felgyülemelő kóros elváltozások – ideértve a szomatikus genetikai elváltozásokat, mutációkat és a sejtben kifejeződő makromolekulák szabályozott rendjének, transzkripciójának, epigenetikai szabályozásának, jelátvitelének megváltozását – részben a virális onkoproteinek közvetlen hatásaként alakulnak ki, részben a kromatin instabilitás következményeként alakulnak és szelektálódnak ki. A virális onkoproteinek közvetlen hatásainak feltérképezése az alap kutatásokon túl gyakorlati jelentőséggel is bírhat, mivel a direkt hatásokra kialakult elváltozások potenciális célpontjai az autonómmá vált sejtfunkciók gátlásának. Kutatásaink tervezésekor ilyen jellegű kérdés volt az Src non-receptor tirozinkinázok aktiválódásának mechanizmusa. Az Src családba tartozó citoplazmatikus kinázok hasonló szerkezetűek. Aktiválódáskor az addig zárt molekulaszerkezet kinyílik és az aktivációs hurokban elhelyezkedő tirozin foszforilálódása az enzimaktivitás fokozódását eredményezi [40, 41]. A fokozott Src kinázaktivitás számos malignomában megfigyelhető így méhnyakrákban is [42], de az invazivitással egyenes arányban és az E-cadherin expresszióval fordított arányban korreláló fokozott Src aktivitás [43] hátterében nem szomatikus genetikai elváltozások állnak [41, 44], ami transzkripció vagy poszttranszkripció mechanizmusra utal. Ez alapján a kísérleti tervezés idején nyitott volt a kérdés, hogy az Src aktivitást közvetlenül képesek-e fokozni a HPV onkogének.

Humán papillomavírusok előfordulása emberi megbetegedésekben

Kután papillomavírusok

A kután HPV típusok közül a *verruca vulgaris* okozó HPV-1, -2 és -4 típusok kórokozó szerepe jó ismert. Ritkább *verruca* típusokban HPV-3, -6, -7, -10 típusok szoktak előfordulni. Az eddig említett típusokra kevés figyelem irányul, mivel terápiás következménye egyelőre nem látszik sem a vírus jobb megismerésének, sem célzott gátlásának és a közegészségügyi jelentőség is elhanyagolható. Sajátos csoportot alkotnak a szintén bőrt fertőző EV típusok (HPV-5, -8, -12 -14, -17, 19-25). Az *epidermodysplasia verucciformis* (EV) ritka megbetegedés, amely familiárisan halmozódó, örökletes immundeficiencia talaján alakul ki. A betegek immunrendszere nem képes kontrollálni az EV típusokkal fertőzött hámsejtek proliferációját. Klinikailag vöröses, barnás makulo-papulózus multiplex elváltozások alakulnak ki, amelyek malignizálódhatnak is.

Az *epidermodysplasia verucciformis* betegséghez hasonló megfigyelést tettek transzplantált betegekben, akikben sokszorosára nő a laphámsejtes bőrrák előfordulása. Ezen tumorokban is elsősorban EV típusok fordulnak elő. Felvetődött, hogy az immunkompetens populációban is HPV-k

okoznak non-melanoma típusú bőrrákot, laphámsejtes *carcinomát* és *carcinoma basocellularét*. A betegség-specifikus halmozódás megítélése azonban komoly akadályokba ütközött. A HPV előfordulása nem általános, a laphámsejtes *carcinomák* mintegy felében, a *carcinoma basocellulare* biopsziák mintegy negyedében mutatható ki HPV vírus [45], ami nem haladja meg az egészségesekben észlelt átfertőzöttséget [46], azaz nem lehet betegség-specifikus halmozódást kimutatni. A tumor teljes terjedelmében szintén ritkán mutatható ki a HPV fertőzés [47]. A bőrnek és azon belül is a *szőrtüszőknek* sokkal inkább *reservoir szerepe* van a mind a kután, mind a mukozális HPV fertőzésekben [48].

Mukozális papillomavírusok, anogenitális papillomavírusok

A nyálkahártyákat fertőző mukozális típusokat a szájüreg, a légutak és az anogenitális régió többrétegű el nem szarusodó laphámjából szokták kimutatni. Két mukozális típus (az *oralis focalis epithelialis hyperplasia* elváltozást okozó HPV-13, HPV-32) kivételével valamennyi előfordul az anogenitális régióban. Az anogenitális régió egyedülálló abban a tekintetben, hogy az ott kialakuló laphámsejtes *carcinomák* és *adenocarcinomák* közel 100 %-ban hordoznak valamilyen HPV típust [49] és egy-egy tumoron belül a HPV genom állapota is klonálisan egységes [50]. Ép immunrendszer mellett az anogenitális régióban a méhnyak transzformációs zónája a karcinogenezis szempontjából legkritikusabb terület. A méhnyakrák a prevenció szűrés bevezetése előtt a nők második leggyakoribb rosszindulatú daganata volt, míg a régió többi laphámsejtes *carcinomája*, a *vulva*, *penis*, *anal* *carcinomák* akkor is, ma is a ritka malignomák közé tartoztak és tartoznak.

A *betegség specifikus halmozódást* érthető módon *cervix carcinomában* és rákmegelőző elváltozásaiban vizsgálták a legkiterjedtebben. A *cervix carcinomát* megelőző elváltozások már a HPV éra előtt jól ismertek voltak és diagnosztikus szűrésük képezi a Papanicolaou által bevezetett és azóta jelentősen továbbfejlesztett méhnyakszűrés alapját. A makroszkópos elváltozások a *condylomáktól* az invazív rákig különböző formában jelennek meg. A *verruca* megfelelője a nyálkahártyán a *condyloma* (genital wart), amely exofitikusan (*condyloma acuminatum*) vagy laposan (*condyloma plana*, flat wart) növekszik [51]. A rákmegelőző állapotra is utalhatnak makroszkópos elváltozások (*leukoplakia*, *mozaik*, *stb.*), azonban szűrésük napjainkig a citomorfológiai értékelésen alapul. A többrétegű laphámából kiinduló diszpláziás és neopláziás elváltozásokat enyhe intraepiteliális lézió (low grade SIL, LSIL), súlyos intraepiteliális lézió (high grade SIL, HSIL) és invazív *carcinoma* kategóriákba lehet sorolni a citológiai értékelés során, valamint létezik egy nagyobb atípusos kategória, amelyet tovább osztottak ASC-US és ASC-H alcsoportokra. Az ASC-US nem tekinthető egyértelműen negatívnak, míg az ASC-H esetében HSIL nem zárható ki. A nyakcsatorna mirigyhámjából kiinduló folyamatokat citológialag, atípusos mirigyhám, atípusos mirigyhám neoplázia gyanúval, *adenocarcinoma in situ*, és invazív *adenocarcinoma* kategóriákba lehet osztályozni [52].

Az onkológiai prevenció részét képezi a progreáló folyamatok sebészi kimetszése és a szövettani vizsgálat, amely a laphámredű folyamatokat a *cervicalis intraepithelialis neoplasia* (CIN), *in situ carcinoma*, mikroinvazív és invazív *carcinoma* kategóriákba különíti el. A CIN léziókat enyhe (CIN-1), közepes (CIN-2) és súlyos (CIN-3) osztályokba sorolják. A CIN-1 szövettanilag jóindulatú, akárcsak a *condylomák*, citológiai megfelelője az LSIL. A CIN-3 és az *in situ carcinoma* a teendők szempontjából egy kategóriának számít. A HSIL citológiai eredmény mögött az esetek többségében CIN-2 vagy súlyosabb lézió áll, de az ASC-H és az ASC-US citológia mögött is lehet olyan jól körülírt elváltozás, amelynek szövettani vizsgálata CIN-2 vagy súlyosabb léziót tár fel.

Az onkológiai prevenció vagy rosszabb esetben az onkológia diagnosztika során ill. hosszabb-rövidebb követés alatt a jóindulatú és a progreáló onkológiai folyamatok klinikailag jól elkülöníthetők. Az anogenitális HPV típusok közül a HPV-16, -18, -31, -33, -35, 39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, -82 szignifikánsan halmozódik az invazív rákban és rákmegelőző állapotokban és a **magas onkogén kockázatú** (*high-risk*) **csoportot** alkotják [53]. Jóindulatú hámburjánzásokban fordulnak elő a HPV- 6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81, -89 típusok, amelyek az **alacsony kockázatú** (*low-risk*) **csoportot** alkotják. Utóbbi fertőzésekről nem lehetett kimutatni, hogy fokoznák az onkológiai kockázatot. Onkológiai szempontból létezik egy harmadik csoport is, a lehetségesen onkogén HPV típusok (HPV-26, -53, -66, -67, -68), amelyek szintén előfordulhatnak méhnyakrákban és filogenetikailag is közeli rokonságban állnak az onkogén típusokkal [54].

Mukozális papillomavírusok extragenitális megbetegedésekben.

A női genitáliák HPV fertőzése ráterjedhet a magzatra a szülőcsatornán áthaladás közben, aminek következtében *laryngealis* ill. *nasalis papillomatosis* alakulhat ki. Az utóbbi két kórképben és a ritka *conjunctivalis papillomákban* HPV6 és HPV11 a fertőző ágens ugyanúgy, mint az anogenitális régió *condylomáinak* többségében [6]. A HPV-k a szájüregben is okozhatnak *condyloma*-szerű elváltozásokat ill. *focalis epithelialis hyperplasiát*. Az utóbbi megbetegedést HPV13 és HPV32 okozza [55]. Az onkogén HPV típusok, főleg a HPV-16 a fejnyaki régió laphám *carcinomás* eseteinek egy jelentős részében jelen vannak, akárcsak a rákmegelőző folyamatokban [56].

A HPV fertőzés ellen kialakuló immunválasz

A *cervix uteri* nyálkahártyájának immunvédelmében is T-(CD4+ és CD8+) és a B-limfociták vesznek részt [57]. Az epitélium rétegei között vannak a dendritikus sejtek csoportjába tartozó Langerhans sejtek, amelyek feladata a megfelelő antigén prezentálás. A víruskapszid-specifikus antitestek kiválasztódnak a nyálkahártya felszínére és védenek, ha ugyanazon papillomavírus típussal újabb fertőzés következne be. A védő hatású ellenanyagok az L1 major kapszid protein natív, konformációs epitópjait ismerik fel [58]. Természetes fertőzés során az ellenanyag válasz larváltan jelenik meg, termelődése függ a kumulatív antigén terheléstől és az egyéni válaszkészségtől. A korai antigének

ellen termelődött antitestek megjelenése epidemiológiailag jól korrelál a kialakult betegséggel, de jelentős egyéni különbségek lehetnek [59].

A HPV fertőzés az esetek többségében tranziens [60, 61], a fertőzött sejteket a szervezet eliminálja. Még a fertőzés okozta intraepiteliális lézió is reverzibilis állapotnak tekinthető, sokszor beavatkozás nélkül is visszafejlődik. Az involúciós állapotú léziókban erős mononukleáris beszűrődés látható szövettani vizsgálattal [57]. Immunszuppresszált állapotban és HIV szeropozitív személyekben megnő a szimptomás HPV fertőzések gyakorisága [62]. A *cervix carcinomák* többségében teljesen vagy részlegesen megszűnik a HLA-I expresszió [63], ami a sejtes immunitás kikerülésére utal.

A méhnyaki léziók progressziója korrelál a sejtes immunválasz polarizációjával. A szérum IL-2 szint megnövekedése a kedvező kimenetellel korrelál HPV-16 és HPV-18 pozitív léziók esetén [64], míg a Th2 polarizációra utaló csökkent IL-2, IFN-gamma és emelkedett IL-4, IL-10 a progresszióval korrelál [65]. A méhnyak transzformációs zónájában más szövetekhez képest fiziológiásan magasabb TGF- β 1 és IL-10 expresszió, ami az egyik magyarázat lehet arra, hogy ép szisztémás immunitás mellett miért sokkal magasabb a HPV indukált *carcinomák* kialakulásának esélye ezen a területen, mint bármely más mukozális hámon [66]. Ugyan az IL-10 termelés az ovulációs ciklustól függetlenül állandó [67], mind gazdaszervezeti tényezők, mind fertőzések jelentős egyéni variációkhoz vezethetnek a citokin szintekben [68, 69]. A premalignus elváltozásnak számító közepes vagy súlyos fokú CIN léziókban az IL-10 expresszió tovább emelkedik és együtt jár az IFN-gamma expresszió csökkenésével [66, 70]. Lokálisan az IL-10 elsősorban az antigénprezentációt gátolja [71].

Méhnyakszűrés, a méhnyakrák szekunder prevenciója

Történetileg, a méhnyakrák kialakulása és mortalitása elleni küzdelem első tömegesen hatékony sikerét a Papanicolaou által bevezetett citomorfológiai szűrés jelentette [72], ami szekunder prevenciós eljárásnak minősül, mivel lehetővé tette a betegség felismerését korai gyógyítható stádiumban. A teljes populációra kiterjedő szűrés jelentős áttörést hozott a méhnyakrák okozta halálozás csökkentésében, azonban hiába volt nagy áteresztőképességű szűrő módszer a Papanicolaou-féle onkocitológiai szűrés, önmagában alkalmazva két területen is kívánnivalókat hagyott maga után. Az egyik ilyen terület volt a nyakcsatornából kiinduló többnyire mirigyhám eredetű folyamatok nem eléggé érzékeny felismerése. A másik probléma a rendszeresen szűrt populációkban jelentkezett, ahol éppen a rendszeres szűrés eredményeként az előrehaladott folyamatokra utaló citológiai eredményektől eltolódott az arány a bizonytalan, átmeneti eredmények felé, amelyet a régi Papanicolau féle osztályzás szerint P3 kategóriaként jelöltek meg. Az utóbbi a későbbi gyermekkihordási esélyeket negatívan befolyásoló túlkezelések dilemmáját hozta magával.

A fenti okok miatt magának a citomorfológiai kenetnek a kiértékelési szempontjait folyamatosan fejlesztették, az áttörést a kilencvenes évek elején bevezetett amerikai Bethesda kritériumok hozták

kockázatú HPV típus jelenléte **onkológiai kockázatot jelez**, míg ha nem mutatható ki, akkor nem kell onkológiai kockázattal számolni, a HPV kimutatásnak **kiváló a negatív prediktív értéke**. Az onkogén HPV fertőzés által jelzett kockázat önmagában nem jelenti azt, hogy onkológiai folyamat zajlana a méhnyakon, a szűrésen kiemelttekkel kapcsolatos további teendők a citológia ismétlését, a HPV kimutatás ismétlését, kolposzkópos vizsgálatot legvégső esetben pedig szövettani vagy terápiás kimetszést foglalnak magukba. Az egyes szűrési algoritmusok közötti különbségek a non-invazív és invazív teendők sorrendjében időzítésében nyilvánulnak meg.

HPV vakcináció, a méhnyakrák primer prevenciója

Az ezredfordulóra bizonyítottá vált, hogy a méhnyakrák kialakulásának szükséges feltétele az onkogén HPV típusok által okozott fertőzés [49]. A papillomavirális kapszid szerkezetét biztosító L1 major kapszid proteinnél bebizonyosodott, hogy képes üres vírusszerű partikulákká (VLP = virus like particle) összeállni [14], amelyek szerkezetileg és immunológiailag nem különböznek a vad HPV viriontól. A VLP szerkezet nélkül az immunodomináns, típus-specifikus neutralizáló epitópok sem alakulnak ki [15, 79]. Rekombináns úton előállították a legjelentősebb onkogén (16, 18) és nem onkogén (6, 11) HPV típusok VLP verzióját és világszerte egy bivalens (16, 18) és egy kvadrivalens (6, 11, 16, 18) vakcina került bevezetésre. A VLP alapú vakcinák hatékonyan csökkentik a HPV indukált rákmegelőző elváltozások kialakulását, amennyiben a HPV fertőzés előtt megtörténik a teljes alapimmunizálás. A HPV vakcinálás hatékonyságát a méhnyakrák megelőzésében az elkövetkező évtizedek fogják megmutatni. Hármás és négyes fázisú tanulmányokban a rákmegelőző elváltozásokra vonatkoztatva vizsgálták a hatékonyságot és azt tapasztalták 5 ill. 10 éves távlatban hatékonyan megelőzi a vakcina típusok által okozott rákmegelőző léziókat ill. kimutatható a másodlagos marker anti-L1 ellenanyagválasz. [80-84].

A HPV fertőzéseken végzett epidemiológiai megfigyelések korábban felvetették, hogy a HPV vakcina akkor várható leginkább hatékony, ha a vakcinálás a természetes expozíció előtt, azaz még a fogékony egyéneken megtörténik. A természetes fertőzést az alapimmunizálás teljes tartama, azaz az utolsó oltást követő 1 hónapig kerülni kell a biztos hatás érdekében. Az epidemiológiai megfigyelésekből levont következtetéseket célzott tanulmányokban közvetlenül is igazolták és az alapján a 11-13 éves korú lánygyermekeket képezik a HPV vakcina ideális célcsoportját. Az ideális célcsoportban a vakcina közel teljes mértékben védelmet nyújt a vakcina típusok által okozott hámelváltozások ellen. Ugyanakkor az idősebb korcsoportok felzárkóztató (catch-up) immunizálását is vizsgálták. A későbbi korcsoportokban a vakcina hatékonyságát csökkentette, ha az alapimmunizálás idején HPV fertőzés vagy HPV indukált hámelváltozás volt jelen. A HPV-s kórtörténet mellett a hatékonyságbeli csökkenést mind az elsődleges vakcina típusok, mind a non-vakcina onkogén típusok által okozott cervikális hámelváltozások vonatkozásában megfigyelték [85]. A non-vakcina típusok

vizsgálatával a keresztvédelem hatékonyságát vizsgálták. A kvadrivalens vakcinálás után részleges, de szignifikáns keresztvédelmet a HPV-31 által okozott megbetegedésekkel szemben lehetett megfigyelni [86], míg a bivalens vakcinálás után a HPV-31, -33, -45 és -51 típusok által okozott megbetegedésekkel szemben [87]. Az FDA 2014 decemberében engedélyezte a nonavalens vakcinát, amely a kvadrivalens vakcinában található elsődleges vakcinatípusokat kiegészíti a HPV-31, -33, -45, 52, és -56 gyakori másodlagos vakcinatípusokkal.

Epigenetikai mechanizmusok szerepe a génexpresszió szabályozásában

Az epigenetikai szabályzás alatt olyan örökíthető, továbbadható génexpressziós mechanizmusokat értünk, amelyek nem járnak a genom DNS szekvenciájának megváltozásával. Ugyanakkor mind a nukleotid bázisokon, elsősorban citozinon, mind kromatint alkotó fehérjéken kialakulnak olyan poszttranszkripciós módosítások, amelyek az adott kromoszóma szakasz inaktiválásához, csendesítéséhez vezetnek. Az egyes szakaszok kromatin állománya vagy dekonzenzált, transzkripciósan aktív eukromatin állapotban vagy kondenzált, transzkripciósan inaktív heterokromatin állapotban van. Az utóbbi állapot létrejöttét alapvetően a DNS metiláció határozza meg [88, 89]. A DNS metiláció elsődlegesen olyan citozinokon következik be, amelyet guanin követ, azaz a DNS metiláció elsődleges célpontjai a CpG dinukleotid szekvenciák [90]. A metilációt DNS-metiltranszferáz enzimek végzik, amelyeket DNMT1, DNMT2 és DNMT3 osztályokba sorolnak. A DNMT1 a CpG metilációs mintázat örökítéséért felelős, szubsztrátja hemimetilált DNS, a DNMT3A és DNMT3B de novo metiltranszferáz aktivitással rendelkezik, a metilálatlan DNS új metilációs mintázatának kialakítására képesek [88, 90].

A humán genomban több tízezer CpG sziget fordul elő, amelyek 1-2 kb méretű CpG dinukleotidokban gazdag területek és jelentős részük a konstitutívan expresszáldó háztartási génekhez kapcsolódik. Ugyanakkor az olyan leszármazási-vonal specifikus génekben, mint egyes citokinekében (interferon-gamma, IL-4 [91, 92] a promoterben csak egy-egy CpG hely fordul elő. Ezen CpG helyek metilációja fordított arányban áll transzkripciós aktivitással. Az ilyen egyedi CpG helyek metilációja közvetlenül is akadályozhatja egyes transzkripciós faktorok kötődését a promoterhez, amennyiben a transzkripciós faktor kötőhelye tartalmaz CpG szekvenciát [93]. A metilált DNS ugyanakkor szignálként is működik a kromatinfehérjéket poszttranszlációsán módosító enzimek számára. A kromatin fehérjék, elsősorban a H3 és H4 hisztonok kovalens módosításai határozzák meg alapvetően, hogy a kondenzált heterokromatin vagy a dekonzenzált eukromatin szerkezet fog-e kialakulni [94].

A legjobban ismert hiszton modifikáció a H3 és H4 hisztonok acetilációja, amelyet hiszton-acetiltranszferáz enzimek végeznek a H3 hiszton K9 és K14 lizinjein, valamint a H4 hiszton K5, K8, K12 és K16 lizinjein. A módosítás a nukleoszóma fellazulását eredményezi, így a transzkripciós aktivátorok jobban hozzáférnek a génekhez. Végeredményben a hisztonacetiláció a transzkripciós aktivitást segíti elő. A hiszton acetiláció reverzibilis állapot, az deacetilálást hiszton-deacetiláz

enzimek végzik, amelyeknek fontos szignálja a metilált CpG dinukleotid szekvencia, így a CpG metiláció transzkripció gátlást vagy akár géncsendesítést eredményez [89, 94].

Bétaherpesvírusok, gammaherpesvírusok és a periodontitis apicalis chronica

A herpesvírusok általános jellemzése és osztályozása

1. táblázat Humán herpesvírusok

	<u>hagyományos</u>		<u>hivatalos</u>	
	név	rövidítés	név	rövidítés
<i>Alphaherpesvirinae</i>	herpes simplex vírus 1	HSV-1	humán herpesvírus 1	HHV-1
	herpes simplex vírus 2	HSV-2	humán herpesvírus 2	HHV-2
	varicella-zoster vírus	VZV	humán herpesvírus 3	HHV-3
<i>Betaherpesvirinae</i>	humán cytomegalovírus	HCMV	humán herpesvírus 5	HHV-5
			humán herpesvírus 6A	HHV-6A
			humán herpesvírus 6B	HHV-6B
			humán herpesvírus 7	HHV-7
<i>Gammaherpesvirinae</i>	Epstein-Barr vírus	EBV	humán herpesvírus 4	HHV-4
	Kaposi sarcoma herpesvírus	KSHV	humán herpesvírus 8	HHV-8

Az ismert humán herpesvírusok 3 alcsalád, az Alpha-, a Beta- és a Gammaherpesvirinae között oszlanak meg (1. táblázat). Az első öt fajnak inkább a hagyományos neveit használják a mindennapos orvosi gyakorlatban, míg a hivatalos elnevezés (humán herpesvírus (HHV- 1-8) taxonómiai alapon történik.

Természetes körülmények között a herpesvírusok *szigorúan gazdaspecifikusak*, azaz csak a saját gazdafaj egyedei között terjednek. Más fajok herpesvírusai közül az embert egyedül a *majomharapással terjedő herpesvírus B* képes megbetegíteni, magas letalitású *encephalitist* okoz. A *Herpesviridae* családra jellemző morfológiai jegyek a *kettős szálú lineáris nagyméretű (150-250 kb) DNS genom*, a *vírusburok (peplon)*, valamint az *ikozahedrális (kubikális) szimmetriájú nukleokapszid* és a burok között található *amorf mátrixanyag*. A herpesvírusok *sajátos replikációja* során a DNS genom a fertőzött sejt magjába jut, ahol vagy beindul a *lítikus* azaz produktív vírus ciklus vagy *látens fertőzés* alakul ki. A herpesvírusokkal történt primer fertőzések következtében *életreszóló látencia* alakul ki a gazdaszervezetben, azaz a virális genom önállóan nem - legfeljebb csak a gazdasejt genomjával szinkronban - replikálódik és a látensen fertőzött gazdasejtben nem képződnek olyan

virális fehérjék, amelyekkel szemben fel tudna lépni az immunrendszer. A herpesvírusokkal szemben hatékony immunválasz alakul ki, amely megakadályozza, hogy a gazdaszervezetet veszélyeztető szövetkárosodás alakuljon ki a reaktiváció következtében. Azonban az immunvédekezés természetes (pl. életkor) vagy szerzett (pl. HIV vírus) legyengülése következtében a humán herpesvírusok életet veszélyeztető megbetegedéseket okoznak, akár primer, akár reaktiválódó fertőzés következtében [95]. Az alphaherpesvírusok gyorsan replikálódó citolitikus vírusok, a fertőzött területen a nekrozis és a velejáró gyulladás a domináló szöveti elváltozás. A herpes simplex vírusok *gingivostomatitist*, *herpes labialist*, *keratoconjunctivitist*, *herpes genitalist*, *meningitist*, *encephalitist*, *ekzema herpeticum* Kaposi-t okozhatnak. A varicella-zoster vírus primer fertőzés során bárányhimlőt, szekunder reaktiváció során övsömört okoz. A jelen értekezésben a béta- és a gammaherpesvírusokkal részletesen foglalkozunk.

Humán cytomegalovírus

A humán cytomegalovírus (HCMV) világszerte elterjedt vírus, földrajzi helyzettől és jóléti viszonyoktól függően a populáció 50-90%-a szeropozitív [96, 97]. A HCMV leggyakrabban nyállal terjed, de genitális váladékból is kimutatható a vírus [98]. Az intrauterin fertőzés transzplacentáris úton jön létre, a perinatális fertőzések a szülőcsatornán történő áthaladáskor vagy születés után az anyatejes táplálással alakulhatnak ki. A HCMV transzplantációval és transzfúzióval is átvihető. A HCMV fertőzések többsége két korcsoport között oszlik meg, kisdedek fertőzése nyál útján következik be, míg a tinédzsereknél és fiatal felnőtteknél az új szexuális partner szokott a fertőzés forrása lenni. Az utóbbi epidemiológiai szituáció a fejlett országokban jelentős, ahol az átfertőzöttség viszonylag alacsony és így magas marad a fogékony felnőttek aránya [98].

Lítikus fertőzés

A HCMV genom lineáris formájának két végén terminális ismétlődő szekvenciák vannak, a genom belső szakaszait 2 egyedi szekvencia régió (hosszú: UL és rövid: US) és a kettőt elválasztó internális ismétlődő régió alkotja. A kódoló szakaszokat, géneket a régióon belül sorszámokkal különítik el (pl. UL122). A herpesvírusok általános replikációs sémáját követve a HCMV replikációs ciklusában is azonnali korai (IE), korai (E) és a késői (L) szakaszok különíthetők el [99]. A sejt megfertőződése után a vírusgenomban legalább 4 szakaszból azonnal megindul az IE mRNS képződés, amelyek közül a legtermékenyebb és legjelentősebb az UL122 ill. UL123 génekről kifejeződő IE1 és IE2 fehérjék expressziója [100]. Az IE1 a saját promotor transzaktivátora [101], az IE2 a korai (E) és késői (L) gének kifejeződését kontrollálja és a vírus ciklus késő fázisában represszálja az azonnali korai szakaszok expresszióját [102, 103]. A US3 azonnali korai szakaszon kódolt ER-fehérje gátolja a HLA-peptid komplex kijutását a sejtfelszínre [104]. A korai (E) fázisban elsősorban a DNS replikációban résztvevő gének aktiválódnak (UL44, UL54, UL112-113). A virális genom replikációja után a késő (L) fázisban a virionokat felépítő kapszid-, membrán- és mátrix fehérjék szintetizálódnak, de van köztük a mátrix-foszfoprotein pp65 (UL83) képviselője is, amelynek expressziója már a DNS replikáció alatt elkezdődik [105]. Az új virionok a sejtmagban állnak össze és bimbózással szabadulnak ki a gazdasejtből.

Látens HCMV fertőzés

A látens fertőzésben nem replikálódik a vírusgenom és virionok sem képződnek. A vírusgenomon belül az UL114 szakaszból íródnak át RNS-ek, amelyeket ezért látencia asszociált transzkriptumoknak neveznek [106]. A látens fertőzést fenntartó gazdasejtek a perifériás vér monocitái [107], a csontvelői CD34+ myeloid progenitor őssejtek, a dendritikus sejt (DC) prekurzorok, valamint a nyálmirigyek és a

vesetubulusok epiteliális sejtjei [108]. Amikor a monociták kilépnek az extravazális térbe és makrofággá differenciálódnak, akkor a HCMV fertőzés is reaktiválódik [97] és a képződő új virionok képesek kötőszöveti és endoteliális sejteket megfertőzni [109, 110]. Ha a fertőzés reaktiválódik, akkor a nyálmirigyekből és vesetubulus hámsejtekből a nyállal ill. a vizelettel a külvilágba ürül a vírus.

Immunmoduláns hatások HCMV fertőzésekben

A HLA-peptid komplexet nemcsak az azonnali korai US3 géntermék képes visszatartani a gazdasejt endoplazmatikus retikulumában, hanem későbbi fázisokban is képződnek ilyen fehérjetermékek (US2, US6, US11) [111]. A HCMV fertőzés az antigén prezentáló dendritikus sejteken is gátolja a HLA I és HLA II expressziót [112]. A HCMV fertőzés környezetében károsodik a leukociták kemokin mediált migrációja [113]. A HLA I homológként viselkedő UL18 fehérjetermék killer inhibitor receptorként (KIR) viselkedik, megelőzi, hogy az NK sejtek előljék a fertőzött sejtet [114]. A fertőzött sejten fokozott mértékben megjelenő Fc-receptorok is csökkentik az humorális védekezés hatékonyságát. A fertőzés fokozza a proinflammatorikus TNF-alfa, IL-1 és IL-6 expresszióját [115, 116].

A HCMV klinikai jelentősége

„...Ép immunrendszer mellett a primer fertőzés lehet tünetmentes vagy *mononucleosis infectiosa* alakulhat ki, amelyben a heterofil agglutinációs teszt (Id. Epstein-Barr vírus) negatív, abnormális májfunkció, esetleg enyhe hepatitisz jellemzi.

Immunológiailag károsodott egyéneknél, különösen a celluláris immunitás gyengülése miatt mind a primer, mind a reaktiválódó fertőzés súlyos megbetegedést okozhat. A szervtranszplantációkat követő anti-rejekciós terápia egyik leggyakoribb mellékhatása a CMV *pneumonitis*. AIDS-ben inkább *chorioretinitis*, *colitis*, *encephalitis* formájában jelentkezik a CMV fertőzés.

Kongenitális és perinatális CMV fertőzések. A CMV a leggyakoribb kongenitális fertőzés. Elsősorban a terhesség alatt bekövetkező primer CMV fertőzés következtében alakul ki, de nagyon kis eséllyel korábban megszerzett és a terhesség alatt reaktiválódó CMV fertőzés is fertőzheti a magzatot. A kongenitálisan fertőzött újszülöttek kb. 10 %-ában figyelhetők meg a tünetek és további kb. 15 %-ukban évek múlva fejlődhetnek ki rendellenességek. A születéskor tüneteket okozó congenitalis CMV fertőzést **cytomegaliás zárványbetegségnek** nevezik, melynek tünetei az idegrendszerben *microcephalia*, *mentális retardáció*, *epilepsia*, *periventrikuláris kalcifikáció*, *szenzorineurális sükettség*, a szemben *chorioretinitis*, *optikus atrófia*, a májban *hepatosplenomegalia*, *hepatitis* (sárgaság), a tüdőben *pneumonitis* lehetnek, valamint trombocitopeniás purpurák, hemolitikus anémia is kialakulhat. A születéskor tünetmentes kongenitális CMV fertőzés késői szövődményei halláskárosodás, mentális károsodás lehetnek....” idézet saját műből [95].

Humán herpesvírus 6

A humán herpesvírus 6A és 6B (HHV-6A, HHV-6B) világszerte elterjedt vírusok, főleg nyállal terjednek, a populáció 75-90%-a szeropozitív [117]. A HHV-6A és a HHV-6B nukleotid szekvenciája 90%-ban megegyezik egymással [118], de a két vírus eltérő biológiai és epidemiológiai sajátosságokkal rendelkezik [119]. Mindkét HHV-6 vírus elsődleges célsejtei a CD4+ T-limfociták, de a HHV-6A NK sejtekben és CD8+ T sejtekben is képes replikálódni [120, 121]. A HHV-6 vírusok sejtfelszíni receptora, a CD46 molekula minden sejtmaggal rendelkező sejt felszínén megtalálható és *in vitro* számos sejttypusban, fibroblasztokban, NK sejtekben, epiteliális sejtekben, endotél sejtekben, magzati asztrocitában, oligodendrocitában, microgliában képesek kis mértékben replikálódni [118]. Látens fertőzés HHV-6 fertőzés monocitákban, dendritikus sejtekben, csontvelői őssejtekben alakulhat ki [122-124].

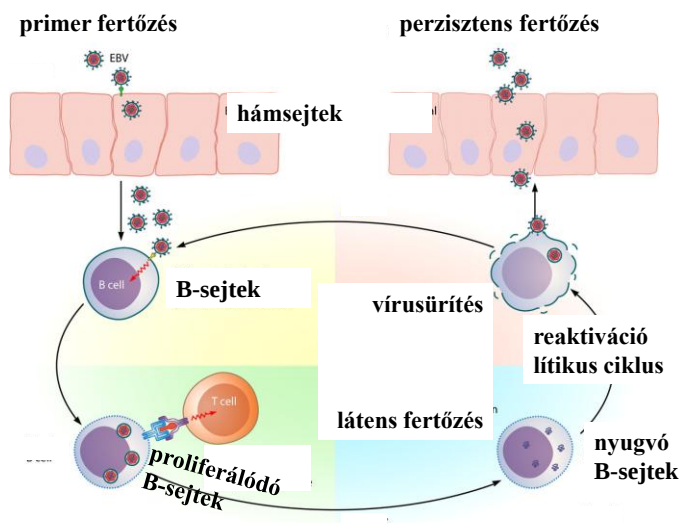
A primer fertőzés többnyire tünetmentesen zajlik kisdedkorban, tünetes formája az enyhe lefolyású, makulopapuláris kiütésekkel járó *exanthema subitum*. A tünetes formát szinte minden esetben a HHV-6B vírus okozza [125]. A HHV-6 fertőzések is látens formában maradnak fenn a szervezetben, immunkompetens egyénekben az időnként előforduló reaktiváció tünetmentesen zajlik le. A virion képződéssel járó permisszív ciklust a HCMV-vel analóg módon azonnali korai (IE), korai (E) és késői (L) szakaszok alkotják [118]. A celluláris immunszuppresszióval járó állapotokban típusosan a HHV-6A fertőzés reaktiválódása okoz komplikációkat. Csontvelő és szerv transzplantáció után vagy AIDS megbetegedésben a reaktiválódó HHV-6A fertőzés *encephalitist*, *chorioretinitist*, *pneumonitist* okozhat [126].

Immunmoduláns hatások HHV-6 fertőzésekben

A HHV-6 vírusok az immunvédekezés sejtjeit fertőzik, a gazdasejtek folyamatainak kismértékű befolyásolása is érinti a védekező hálózatot. A primer fertőzés átmenetileg önmagában is gyengíti a CD4+ T-limfocita gazdasejtek aktív közreműködését igénylő védekezési mechanizmusokat. Emellett a fertőzés olyan változásokat is indukál, amelyek elősegítik a vírus kibúvását segítik az immunvédekezés alól. Gátolja az IL-12 expressziót és a HLA I expressziót, amely a hatékony citotoxikus T-limfocita válasz kialakításához kellene [127]. Gátolja a mintázat felismerő toll-like receptorok jelátvitelét [128]. A gazdasejtben gátolja a CD3 és T-sejt receptor expresszióját, valamint az IL-2 és IFN-gamma termelődést [127]. Fokozza a TNF-alfa, IL-1, IL-1 és IL-15 szekréciót [129].

Epstein-Barr vírus

Az Epstein-Barr vírus (EBV) replikációja



3. ábra **Az EBV replikációja az a gazdaszervezetben** (az ábrát Odumade és mtsai közleményéből [130] vettem át és magyar feliratokkal láttam el)

Az EBV fertőzés elsődlegesen nyállal terjed és a garatnyálkahártyán át jut be a szervezetbe. A hámsejteken átjutó fertőzés a *lamina propria* B-limfocitáit fertőzi a sejtfelszíni CD21-t használva receptorként [131]. A primer fertőzés a B-limfociták blasztos transzformációját és proliferációját idézi elő, az expresszáldó fehérjékkel szemben T-sejtes immunkontroll alakul ki. A szervezeti immunválasz elől a látens fertőzési formával tud elrejtőzni az EBV, amely életreszólóan fennmarad a gazdaszervezetben. A látensen fertőzött B-limfocitákból kisebb-nagyobb rendszerességgel reaktiválódik a fertőzés, ami a nyál útján vírusürítéshez és az EBV fertőzés terjedéséhez vezet (3. ábra).

A virionban a genom kettőszálú lineáris formában fordul elő. A genom két végén terminális ismétlődő szekvenciák (terminal repeat, TR), a genomon belül belső ismétlődő szekvenciák (internal repeat, IR) fordulnak elő. Az utóbbi IR1 jelöléssel is előfordul a korai szakirodalomban a nálánál lényegesen rövidebb IR2 – IR5 szekvenciák megkülönböztetésére. Az IR1 (továbbiakban IR) ~3kb hosszú ismétlődő szekvenciából áll, minden ismétlődő szakasz egy *BamHI* hasítóhelyet tartalmaz, ezért az EBV izolátumok genomjában több *BamHI* W fragmentum van jelen.

A gazdasejtben az EBV genom cirkulárisává válik, ez teszi lehetővé a genom komplett replikációját és egyes fehérjék (pl. LMP-2A/B) kifejeződését. Az EBV genomon belül a *BamHI* fragmentumok alapján jelzik az egyes gének pozícióját, a fragmentumokat a legnagyobb A fragmentumtól a kicsiny Z fragmentumig az angol abc nagy betűivel jelzik. Számos olyan genomszakasz van, amely legalább RNS szinten expresszáldódik, de a biológiai funkciója nem vagy alig ismert, ezért az expresszáldó

genomszakaszokat egységesen 5 karakterből álló névvel jelzik. Példaként, a BZLF1 azt jelzi, hogy a Z fragmentumról balra (L) induló (szenz szálról, mint templátról szintetizálódó) RNS-ek közül az 1. számú szintetizálódik az adott szakaszon. Az DNS adatbázisokban a szenz szál szekvenciája található meg.

A B-limfocitába kerülő és cirkulárisá váló EBV genomról először *BamHI* W fragmentumon található promoterről (Wp) indul meg a transzkripció, a képződő óriás pre-mRNS-ről alternatív mRNS érés után EBNA-2 ill. EBNA-LP fehérjék szintetizálódnak. Az előbbi hatására aktiválódik a Cp promotor, amelyről szintén óriás pre-mRNS szintézis indul, amely szintén alternatív mRNS érés után lehetővé teszi mind a hat EBNA (Epstein-Barr vírus nukleáris antigén) kifejeződését [132, 133]. Az EBV fertőzésben több látencia típus is előfordul (l. később), ha csak a Qp promoterről folyik EBNA expresszió, akkor csak az EBNA-1 fehérje fog kifejeződni (4. ábra). A további látens géntermékek transzkripciója saját promoterről indul el, az LMP1 és LMP2B osztozik közös promoteren, az előbbi transzkripciója balra, az utóbbié jobbra indul a közös promoterről.

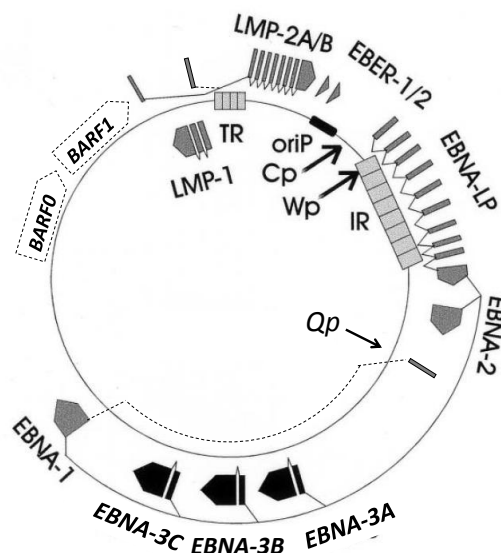
A lítikus ciklust az azonnali korai (immediate early, IE) fehérjék szintézise indítja el a BZLF1 és BRLF1 szakaszokról [134]. Ezek a fehérjék transzaktivátorként működnek, a DNS replikációt irányító korai (E) fehérjék szintézisét indukálják, majd késői (L) struktúrfehérjék szintetizálódnak [135]. Összeépülnek az új fertőzőképes virionok és kiszabadulnak a gazdasejtből (3. ábra).

Látens EBV fertőzés, látens EBV termékek

A gammaherpesvírusok fertőzési ciklusának szabályozásában egyedei mechanizmus az, hogy a többi herpesvírusban is előforduló azonnali korai – korai – késői fehérjék mellett külön fehérjéket és nem kódoló RNS-ek biztosítják a látens állapotot [132]. A látens EBV fertőzésnek több típusa is van, amelyekben az azonnali korai – korai – késői gének inaktív állapota és a virion képződés hiánya a közös vonás.

A látens fertőzésekben kifejeződő EBV termékek

Az Epstein-Barr vírus nukleáris antigének (EBNA) mind expressziós szabályozás alapján, mind sejtbioológiai hatás alapján kétfelé oszthatók. A szétosztás után egy nagy csoportot alkotnak a sejtciklust és sejtprolifrációt fokozó *transzformáló EBNA fehérjék* (LP, 2, 3A, 3B, 3C) és az EBNA-1. Az **EBNA-1** fehérje az OriP replikációs kezdőpontnál rögzíti az extrakromoszomális, cirkuláris vírusgenomot a gazdasejt kromatinjához, biztosítja, hogy a gazdasejt osztódásával szinkronban a vírusgenom is replikálódjon és mindkét utód sejtbe átkerüljön [131, 136]. Az EBNA-1 Gly-Ala ismétlődő motívumokból álló doménje akadályozza az ubikvitin-proteoszomális antigénfeldolgozást és ezáltal a HLA molekulákon történő antigén prezentációt [137].



4. ábra Látens fertőzésekben a cirkuláris EBV genomról átíródó kódoló és nem kódoló RNS molekulák. Cp, Wp, Qp: EBNA mRNS-ek promoterei, OriP: elsődleges replikációs promotor. LMP: látens membrán protein, EBER-ek ill. BARF-ok nem kódoló RNS-ek TR: terminális ismétlődő szekvenciák, IR: internális ismétlődő szekvenciák. (Az ábrát Kienzle és mtsai közleményéből [133] vettem át és Young&Rickinson közleménye [138] alapján módosítottam, a módosításokat dőlt karakterekkel ill. szaggatott vonalakkal jelöltem.)

Az **EBNA-2** transzaktiváló hatása mind virális, mind celluláris géneken megfigyelhető. Az EBV genomon az LMP1 és LMP2B közös bidirekcionális promoterét és az LMP2A promotert aktiválja, valamint Wp promotor használatról a Cp promoterre átváltást serkenti. Az utóbbi révén az összes EBNA fehérje (beleértve sajátmagát is) expresszióját aktiválja [139]. A B-limfocita gazdasejtben aktiválja a CD23 és CD21 expressziót [140], valamint a *c-myc* és a *c-fgr* proto-onkogéneket [141]. Az **EBNA-LP** az EBNA-2 transzaktiváló hatását potenciózza [142].

Az **EBNA-3** (A, B, C) család tagjai szintén transzkripció szabályzó fehérjék és a sejtes immunitás fő célpontjaiként szolgálnak a látens fertőzési szakaszban. A B-limfociták transzformációjához esszenciális az EBNA-3A és EBNA-3C. Az EBNA-3C fokozza a virális LMP-1 és a celluláris CD21 expressziót, míg az EBNA-3B a celluláris CD40 expressziót. Az EBNA-3 fehérjék leszorítják az EBNA-2-t az RBP-Jk celluláris transzkripció faktorról és gátolják a Cp promotert, amellyel saját termelődésüket is szabályozzák [143]. Az EBNA-3C hisztondeacetiláz is képes a transzkripció komplexhez kötni, ami szintén hozzájárul a Cp promotor repressziójához [144].

Az LMP rövidítés a látens membrán proteinre utal. Az **LMP-1** a CD40 jelátviteli útvonalat tartja aktív állapotban [145]. A TRAF és az NF- κ B útvonalon antiapoptotikus hatást fejt ki [146]. A CD40 mimikri révén a B-limfocita fenotípusosan aktivált állapotba kerül és a környezetére immunmoduláló hatást fejt ki (l. később). Az **LMP-2A** és **LMP-2B** az első exonban különböznek egymástól. Az Src non-receptor tirozin kinázokat és B-sejt receptor jelátvitelt tartják aktív állapotban, valamint akadályozza az EBV fertőzés reaktiválódását [147].

Az **EBER-1** (167 nukleotid) és **EBER-2** (172 nukleotid) a legnagyobb mennyiségben képződő látens transzkriptek, nem poliadenilálódnak. Hurokszerű másodlagos szerkezetet vesznek fel és számos celluláris fehérjéhez (riboszomális L22 protein, RIGI protein, stb.) kötődnek, de sejtbiológiai hatásukat még nem sikerült tisztázni [148]. Az EBER-1 szekretálódik az extracelluláris térbe a szomszédos sejtekben TLR-3 mediált interferon választ vált ki [149].

A **BART** (BamHI A rightward transcripts) RNS-ek is érési folyamaton mennek át, az érett RNS sejtbiológiai szerepe kevésbé ismert. Azonban érés során kivágódó intronokból számos különböző mikroRNS képződik köztük olyanok, amelyek az LMP-1, LMP-2A, virális DNS polimeráz expresszióját szabályozzák. A Cp és a Wp promoterről induló óriás pre-mRNS-ből képződnek a **BHRF1 mikroRNS**-ek, köztük olyanok, amelyek a celluláris CXCL-11 kemokin expresszióját szabályozzák [150].

A látens fertőzés típusai

A látens fertőzés típusait a 2. táblázat mutatja be, míg a különböző látens géntermékeket a 4. ábra. A 0-ás típusú látenciában fejeződik ki a legkevesebb látens géntermék, míg a III-as típusúban a látens géntermékek teljes palettája megtalálható [132, 138]. Miután a fertőzés átjut a hámsejteken az EBV a nyálkahártya B sejtjeit fertőzi (3. ábra), amelyekben azonban nem alakul ki a lítikus vírusciklus, hanem a látens csoportba tartozó géntermékek, EBNA fehérjék, LMP fehérjék, EBER és BART nem kódoló RNS-ek teljes palettája (4. ábra) megjelenik [138]. Az így kialakult III. típusú látencia (2. táblázat) hatására a B-limfocita sejtciklusa aktiválódik, amely a vírus oldaláról a sejtosztódással párhuzamos virális replikációt jelenti. A szervezet kontrollja alól kiesett B-sejt szaporodás mind onkológiai, mind immunpatológiai kockázatot rejt. A vírus és gazdaszervezet koevolúciója során a III. típusú látenciát okozó fehérjékkel szemben hatékony T-sejtes védekezés alakult ki [151].

2. táblázat Látens EBV fertőzési típusok

<u>látencia állapot</u>	<u>nem kódoló</u>			
	<u>EBER, BART RNS-ek</u>	<u>EBNA-1</u>	<u>EBNA-LP, -2, -3A, -3B, -3C</u>	<u>LMP1, LMP2A/B</u>
0	+			
I	+	+		
II	+	+		+
III	+	+	+	+

BHRF1 mikroRNS-ek is megjelennek

A látens géntermékek negatív visszacsatolással egymás expressziójára is hatnak (l. fentebb), ami a sejt immunitás kialakulása után az immunválasz alóli kibúvást biztosítja. Fokozatosan megszűnik az immungenitásban is vezető szerepet játszó transzformáló EBNA fehérjék (LP, 2, 3A, 3B, 3C) expressziója, kialakul a II. típusú látencia állapot, majd megszűnik az LMP fehérjék expressziója I. típusú látencia állapotot kialakítva [138, 152]. Az I. típusú látenciában fehérje szinten csak az EBNA-1 fejeződik ki a szaporodó B-limfocita gazdasejtben. Az EBNA-1 esszenciális szerepet játszik az osztódó gazdasejtben az episzomális EBV genom fenntartásában és e szereppel összhangban áll az is, hogy az EBNA gének közös promotere (Cp) mellett kizárólagosan saját promoterről (Qp) is indulhat az EBNA-1 expresszió. Az EBV tökéletes parazita szerepéhez az EBNA-1 azzal járul hozzá, hogy kibújik a fertőzött sejt HLA molekuláin folyó antigén bemutatás alól [137], I. típusú látenciában a gazdasejt megmenekül az antivirális immunválasz elől. Amint a B-limfocitából nyugvó memóriasejt lesz, az EBNA-1 expresszió is megszűnik és kialakul 0. típusú latencia. A nyugvó EBV hordozó memória sejtek aktiválódásakor vagy fordított folyamat indul el és [138], fokozatosan megjelennek látens EBV fehérjék vagy az új virion képződéssel járó lítikus ciklus aktiválódik (3. ábra).

Az EBV különböző látencia állapotai fordulnak elő az EBV eredetű tumorokban. Az afrikai típusú *Burkitt-lymphomában* I. típusú, a *nasopharyngealis carcinomában*, Hodgkin kórban és egyes EBV pozitív T-sejtes *lymphomákban* II. típusú, a sejt immunitást szupprimáló poszttranszplantációs kezelés alatt kialakuló limfoproliferatív megbetegedésekben III. típusú látens EBV fertőzés szokott előfordulni [131, 136, 153].

Az EBV fertőzés immunmoduláns hatásai

Az EBV tökéletesen alkalmazkodott a B-limfocita gazdasejt fiziológiájához, a B-limfocita nyugvó állapotában a vírus is nyugalomban marad, a gazdasejt aktiválódását az EBV is kihasználja, a folyamatot kis mértékben módosítja, fokozza. A funkcionálisan aktív B-limfocita citokin és kemokin szekréció révén önmagában is modulálja a sejt környezetét. Az EBV által is elősegített aktiválódás több citokin (IL-1, IL-10, IL-18, TNF-alfa, TGF-béta) fokozott termelését eredményezi [154] és vannak olyan citokinek is (IL-6, IL-8), amelyek termelődését az EBV fehérjék közvetlenül is fokozzák [155]. Csontos környezetben a TNF-alfa fokozza az oszteoklaszt aktivitást és hiperalgéziát okoz [156]. A TGF-béta gyengíti az antivirális védekezést citotoxikus T sejt funkciókat, toll-like receptor (TLR) szignalizációt gátolva, míg az IL-10 a makrofág aktiválódást és az antigénprezentációt gátolja [157].

Az EBV klinikai jelentősége

Elterjedt vírus, az adott társadalom higiénés és jóléti viszonyaitól függően az átfertőzöttsége korábbi (kisdéd) vagy későbbi (≤ 30 év) korcsoportban éri el a 90% körüli értéket [131, 158]. Átvitelében elsősorban a nyál játszik szerepet, jóléti társadalmakban az EBV fertőzések második nagy hullámát a tinédzserek és fiatal felnőttek *kissing disease* megbetegedése jelenti. Az életkorral nő a primer fertőzés manifeszt megjelenése a *mononucleosis infectiosa*. Ritkán a szervezet nem képes hatékony T-sejtes immunitást kialakítani a *mononucleosis* krónikussá válik, amelynek két formája van, a krónikus aktív EBV fertőzés és az életet veszélyeztető súlyos krónikus aktív EBV fertőzés.

Az EBV transzformáló hatású fehérjéi onkogén hatásúak és amennyiben a T-sejtes védekezés tartósan meggyengül, akkor jó vagy rosszindulatú tumorok képződést segítik elő:

Burkitt lymphoma. Az *afrikai típusú Burkitt lymphoma* EBV fertőzött *B-limfocitákból* fejlődik ki, míg a világszerte előforduló sporadikus eseteknek csak töredéke hordoz EBV-t. Az *afrikai típusú Burkitt lymphoma* endémiás elterjedésének feltétele a malária jelenléte az adott területen. A malária a celluláris és a humorális immunitás közötti egyensúlyt felborítja és stimulálja a B-limfociták proliferációját, ami elősegíti a *B-limfociták immortalizációját*.

Nasopharyngeális carcinoma. Dél-Kínában endémiás megbetegedés. A *nasopharyngealis carcinoma* kialakulásában életvitelbeli és a környezeti tényezők jelentős szerepet játszanak a többi fej-nyaki régióban előforduló *carcinomához* hasonlóan.

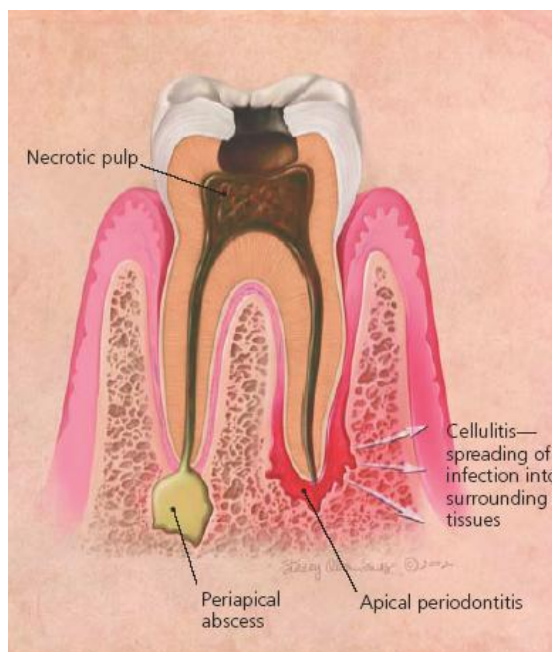
Limfoproliferatív betegségek immunológiailag károsodott egyéneknél. Szervtranszplantáltakban és AIDS-ben szenvedő betegekben alakul ki valószínűleg transzformáló látens EBV proteinek hatására.

Orális hajás leukoplakia. Fehér hámszaporulat a *nyelv laterális oldalán*, az EBV minden esetben kimutatható a lézióban. AIDS-ben szenvedő betegekben, ritkábban transzplantáltakban jelenik meg, ami az alapbetegség prognózisa szempontjából kedvezőtlen annak ellenére, hogy szövettanilag jóindulatú, nem malignizálódik [95].

Az apikális periodontium gyulladásos kórfolyamatai

A fogakat támasztó, rögzítő kemény- és lágy szöveteket nevezik *periodontium*nak, azaz fogágynak. A *periodontium*ot a fognyak és a *marginalis gingiva* (ínyszél) között húzódó speciális szerkezetű hámtapadás (dentogingivális junkció) határolja el a szájüregtől [159]. A szájüreg irányából a fogágy két fő részre különíthető el: a *marginalis periodontium* a marginális íny szél alatti területet foglalja magába, míg az *apicalis periodontium* fog gyökércsúcsa körüli (periapikális) szöveteket.

A periapikális tér gyulladásos elváltozásait típusosan a fertőzött gyökércsatornából kijutó bakteriális fertőzés idézi elő. (5. ábra). A gyökércsatorna fertőződése leggyakrabban előrehaladott *caries* miatt következik be, a szájüregi mikroflórához tartozó baktériumok betérjednek a fogbélbe (*pulpa*) és annak gyulladását váltják ki. A fogbélgyulladás kezdeti szakaszában fakultatív anaerob baktériumfajok dominálnak [160]. Később a lokális oxigéntenzio csökkenése miatt az obligát anaerob fajok szaporodnak fel [161].



5. ábra A periapikális tér gyulladásos elváltozásai: *abscessus periapicalis* (bal oldal) és *periodontitis apicalis* (jobb oldal) (forrás: [162]).

A gyökércsatorna fertőzést okozó endodonto-patogén baktériumok spektrumát magas faji diverzitás jellemzi, a fertőzésben előfordulhatnak fakultatív anaerob *Campylobacter* és *Streptococcus* fajok, valamint az obligát anaerob Gram-negatív *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, *Treponema* és Gram-pozitív *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* nemzetségekbe tartozó fajok [163]. A periapikális gyulladást olyan steril károsodások is

kiválthatnak, mint a fogat érő mechanikus traumák, egyes fogászati anyagok kémiai irritáló hatása [164].

Periodontitis apicalis acuta

A gyulladás savós fázisában a periodontális részbe folyadékgyülem szűródik ki és nyomást gyakorol az idegvégződésekre. Gyorsan alakul ki és gyorsan terjed a gyulladás, ráharapásra vagy akár érintésre is heves fájdalommal társul. Szövettanilag hiperémia, ödéma, monociták és neutrofil granulociták extravazációja, enyhe csontreszorpció és a periodontális ligamentumok károsodás jellemzi [165].

A *periodontitis apicalis acuta purulens* fázisában primer periapikális abscessus jöhet létre, amely az áthajlásban vagy a szájpadon kialakuló fluktuáló duzzanat vérbő nyálkahártyával. Szövettanilag purulens gyulladásként jellemezhető, kifejezett neutrofil granulocita infiltrációval [159].

Periodontitis apicalis chronica

A krónikus gyökérhártyagyulladásban patológiás egyensúly alakul ki az exogén tényezők (endodonto-patogén baktériumok, külső irritáló tényezők) és a szervezeti védekező mechanizmusok között. A nekrotikus fogbél kiváló táptalaja az endodonto-patogén baktériumoknak és egyben a periapikális térbe kerülő baktériumok fő forrása is, de az inkomplett gyökértömés mellett megmaradó holtter is a baktériumok fennmaradását teszi lehetővé. A krónikus gyulladásban a fertőzés továbbterjedését granulációs szövetből álló „határzóna” kialakításával akadályozza meg a szervezet [166]. A *periodontitis apicalis chronica* többnyire tünetmentes lefolyású. A klinikai vizsgálat során esetenként enyhefokú kopogtatási érzékenységet észlelhető, illetve fogbél elhalása a fog elszíneződését okozhatja. A fog radiológiai vizsgálata során az apikális csontreszorpció miatt élesen elhatárolt, kerekded radiolucens terület ábrázolódik a fog gyökércsúcsi régiójában és az érintett fog gyökércsúcsa is reszorbeálódhat.

A patológiás egyensúly a fertőzés és a szervezet között könnyen felborulhat és a krónikus lefolyású betegségben akut fellángolások (exacerbációk) következhetnek be, amelyekhez általában klinikai tünetek (akut fájdalom, ráharapási és kopogtatási érzékenység, apikális régió feletti nyálkahártya felőli nyomásérzékenység) társulnak. Az akut exacerbációk idején purulens beolvadás is történhet, melynek eredményeként szekunder periapikális tályog jön létre. Tüneteiben megegyezik az elsődleges tályoggal, szövettanilag a szekunder tályogot granulomatózus szövet veszi körül. A tályogbennék sipolyjárat (fisztula) ürülhet a nyálkahártyára, bőrre vagy a *sulcus gingivalis*ba. Amíg a sipolyjárat nyitott, addig az érintett fog általában panaszmentes, amikor eltömődik, akkor fájdalmas, lüktető submucosus tályog alakul ki (16).

A krónikus periapikális elváltozás granuloma vagy ciszta formájában manifesztálódhat. A periapikális ciszták többrétegű, elszarusodó laphámmal bélelt üreges képződmények, melyek a Malassez-féle hámszigetektől származnak és fehérvérsejtekkel infiltrált rostos kötőszövet vesz körül [167]. A

cisztahám állandó váladéktermelése környező szöveteken, csontszövetben, foggyökerekben nyomási atrófiát válthat ki.

A periapikális granulomákban hagymalevél-szerűen rétegződnek az egymást követő szövettani zónák. Az elhalt szövetrészeket tartalmazó legbelső nekrotikus zóna közvetlenül a *foramen apicale* körül húzódik. Kifelé haladva az exszudatív zóna, majd a regenerációs sarjszövet által alkotott granulomatózus zóna következik. Legkívül, az alveoláris csonttal határosan, fibrózus zóna helyezkedik el [165]. A domináns szövettani zóna jellege szerint el lehet különíteni exszudatív, granulomatózus, granulofibrotikus és fibrotikus granulomákat [168]. Az kifejezett szöveti nekrosis és exszudáció jellemezhető exszudatív típusú léziókat lehet összefüggésbe hozni a kezdeti akut periapikális léziókkal, illetve a *periodontitis apicalis chronica* akut fellángolásaival [165].

A nekrotikus és exszudatív zónákban nagy számban fellelhető neutrofil granulociták jelentik a gazdaszervezet fő védelmi vonalát a gyökércsatornából kiáramló baktériumokkal szemben, amelyeknek nagy része már ezekben a zónákban eliminálásra kerül [166]. Az exszudatív zónához képest a granulomatózus zónában neutrofil granulocita komponens rovására megnő a limfociták, plazmasejtek, makrofágok és fibrovaszkuláris elemek aránya. Az eozinofil granulociták és természetes ölősejtek (NK sejtek) is megtalálhatóak a periapikális léziókban. A granulomák kialakulásában kiemelt szerepet játszanak a CD4+ és CD8+ T-limfociták, de B limfociták és IgG, IgA, illetve IgM típusú ellenanyagokat termelő plazmasejtek is jelen vannak [165, 169].

Bétaherpesvírusok, gammaherpesvírusok szerepe szájüregi kórképekben

A **humán cytomegalovírus (HCMV)** fertőzések többsége tünetmentesen zajlik le. A primer fertőzés alatt, majd utána kisebb-nagyobb rendszerességgel a nyállal ürülnek a fertőzőképes vírusok. A primer fertőzéshez társuló *mononucleosis infectiosa* járhat lepedékképződéssel a garatíven. *Parodontitis marginalis chronicában* már korábban kimutatták a HCMV jelenlétét 0,3-16% közötti előfordulási arányban [170].

A periapikális folyamatokat vizsgáló tanulmányok vagy a gyökércsúcs sebészi eltávolításával nyert mintákat vizsgáltak, vagy az érintett fog extrakcióját követően a gyökércsúcsról eltávolított periapikális léziókat. A HCMV előfordulását genomi DNS szinten vizsgáló két tanulmány a parodontális helyzethez hasonló prevalenciát talált [109, 171]. Az aktív fertőzést a pp65 mRNS transzkripcióval mutatta ki több tanulmány [172-174], azonban adott populáción belül nem voltak összehasonlítható HCMV DNS és RNS prevalencia adatok. Több tanulmány összefüggést mutatott a panaszos klinikai manifesztáció és HCMV előfordulása között [171-174], míg a lézió radiológiai mérete és a HCMV érintettség között ellentmondó eredmények születtek [171, 173]. Az említett tanulmányokra általában jellemző volt a HCMV fertőzések EBV koinfekcióval előfordulása és a kis esetszámok miatt nem lehetett megbecsülni, hogy az észlelt összefüggések milyen mértékben vonatkoztak magára a HCMV-re.

A **humán herpesvírus (HHV)-6** fertőzésekre jellegzetes szájüregi tünet nincs, bár egyes *erythematosus enanthemák* esetében felvetették az érintettséget. Több tanulmány is leírta a HHV-6 előfordulását *parodontitis marginalis chronicában* [170, 175, 176] olyan klinikai minták vizsgálata alapján, mint a szubgingivális plakk, sulcusfolyadék vagy gingivális biopsziával vett szövetminták. A HHV-6 DNS prevalenciát 4-24,2% közötti tartományban mutatták ki, de a klinikai paraméterekkel nem találtak összefüggést [170]. A korábbi szakirodalomban a HHV-6 és a *periodontitis apicalis chronica* viszonya nem volt ismeretes.

A *Gammaherpesvirinae* alcsaládba tartozó **Epstein-Barr vírus (EBV)** kóroki szerepe több olyan betegségben is ismert, amely a fejnaki régiót érinti. Más kockázati tényezőkkel társulva az EBV okozhat *nasopharyngealis carcinomát* és az arccsontokat nemritkán roncsoló Afrikai típusú *Burkitt-lymphomát*. Az orális hajas leukoplákia jóindulatú hámburjánzás eredménye a nyelv laterális felszínén HIV fertőzöttekben és erős immunszuppresszív kezelés alatt álló betegekben. Az EBV előfordulását leírták *parodontitis* [177], *periodontitis apicalis* [109, 173], és irreverzibilis *pulpitis* [171] kapcsán. Jól kimutatható összefüggést találtak az EBV előfordulása és a parodontális gyulladás súlyossága között [170].

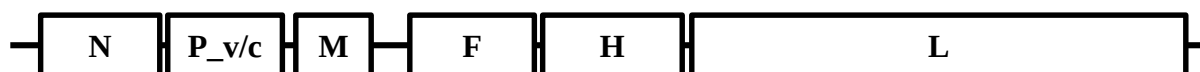
A periapikális léziókat vizsgáló tanulmányok többnyire [172, 173, 178] az EBNA mRNS kimutatásával ritkábban [109, 171] a virális DNS genom kimutatásával a követték az EBV előfordulását. Az EBV fertőzés és a panaszos klinikai manifesztáció [172, 173, 179] valamint az EBV

fertőzés a nagyméretű lézió [109, 173] között külön-külön kimutatott összefüggéseket lehetett találni a szakirodalomban, de a korábbi elemzések nem vizsgálták, hogy a panaszossághoz milyen mértékben járul hozzá az EBV jelenléte és milyen mértékben a lézió kiterjedtsége, mérete.

A béta- és gammaherpesvírusok fentebb részletezett immunmoduláns hatását összevetve a *periodontitis apicalis chronica* kórfolyamatában szerepet játszó citokinekkal [165], két citokinre, a TNF-alfára és a TGF-bétára irányult a figyelmünk. A korábbi szakirodalomban két közlemény fókuszált erre a kérdésre: Az egyik kis mintaszám mellett, tejfogakban nem talált összefüggést az EBV vagy HCMV jelenlét és több citokin species között, TNF-alfa expressziót viszont nem vizsgált [180]. A másik vizsgált TNF-alfa expressziót szintén korlátozott mintaszám mellett, de a panaszmentes csoportban nem volt herpesvírustól mentes eset, ami a következtetések értékét korlátozta [181].

A morbillivírus és az otosclerosis

Morbillivírus



6. ábra A morbillivírus genomszerkezete (5'-3' negatív szál). N: nukleokapszid protein, P: foszfoprotein, M: mátrix protein, F: fúziós fehérje, H: hemagglutinin, L: large (óriás) protein.

A kanyaróvírus a *Paramyxoviridae* család *Morbillivírus* nemzetségébe tartozik, burokkal rendelkezik és közel 16 kb hosszú, negatív egyszálú RNS genomja van (6. ábra). A hazai orvosi latinban a kanyarót, mint fertőzőbetegséget *morbillinak*, a kórokozót morbillivírusnak nevezik. Ezzel szemben az angol orvosi nyelvezetben csak a measles szót használják, a *morbillit* nem. A kanyaróvírus legközelebbi rokonságban a marhapestis (rinderpest) vírussal áll és minden valószínűséggel az állattenyésztés kialakulása után adaptálódott emberre az eredetileg szarvasmarha eredetű vírus. Az adaptáció eredményeként természetes körülmények között csak az embert fertőzi. A fertőzés kontagiozitása igen magas, légutakon jut be a fogékony egyénbe. A típusos kanyaró akutan lezajló, bőrkiütéssel járó megbetegedés, az akut szakaszban lehetnek légúti, idegrendszeri szövődményei. Az emberen kívül egyes majomfajok is fertőzhetők légúti átvitelrel és az emberi kanyaróhoz hasonló akut megbetegedést fejlődik ki bennük. Kísérleti egér, patkány, hörcsög, rágcsálók intracerebrálisan fertőzhetők olyan kanyaróvírus törzsekkel, amelyeket kifejezetten ilyen célra adaptáltak, szelektáltak [182].

A többi paramyxovírushoz hasonlóan a morbillivírus replikációja közben is nagy arányban keletkeznek defektív virionok, amelyekbe replikációra nem vagy alig képes, mutációkat elszenvedő gemoni RNS kópia kerül be. Ez különböző következményekkel jár a fogékony populáció és a fertőzött egyén szintjén. Fogékony populációban a kanyaróvírus hatékony terjedését, fennmaradását egyféle stabil szerkezet és meglehetősen konzervatív genomi szekvencia biztosítja. Élő attenuált vakcinatörzsekkel végzett védőoltás életreszóló protektív immunitást vált ki, amelynek fenntartásához nincs szükség re-expozícióra [183]. A replikáció pontatlansága miatt a fertőzött egyénben viszont kialakulhatnak olyan mutációs variánsok, amelyek nem képesek a teljes vírusciklusra. Az akut fertőzés lezajlása után maradhatnak olyan fertőzött sejtek, amelyekben tartósan fennmarad a defektív vírus, részleges virális expresszióval. Ez a virális mechanizmus volt megfigyelhető a *szubakut szklerotizáló panencephalitis*ben, a kanyaró késői fatális szövődményében [182].

A perzisztálást okozó szomatikus mutációk nem azonos mértékben érintik a kanyaróvírus fehérjekódoló szekvenciáit. A nukleokapszid N protein a genomi méretű negatív és pozitív RNS

szállal képez struktúrát [184], valamint a P és L proteinekkal. A P leolvasó keret ún. V és C virális fehérjéket is kódol a P teljes méretű foszfoprotein mellett. A C fehérje transzlációja keret eltolással történik, a V fehérje ciszteinben gazdag C terminális doménje különbözik a P fehérjétől mivel egy extra non-templát G leolvasás történik a riboszómán [185, 186]. A P, C és V fehérjék a replikációs és a transzkripciós komplexekben vesznek részt. Az M mátrix, F fúziós és H hemagglutinin fehérjék a vírusburokban találhatóak. A hemagglutinin kapcsolódik a célsejt CD46 molekulájához. Az F protein felelős azért, hogy a fertőzött sejtek fuzionálnak a környező sejtekkel, így a vírus közvetlenül terjed sejtről-sejtre anélkül, hogy infektív virionok szabadulnának ki a gazdasejtből. A L protein az N-P-L komplex polimeráz aktivitását biztosítja. A **defektív kanyaróvírusok által okozott perzisztálás** bizonyított klinikai manifesztációja a *szubakut szklerotizáló panencephalitis* [187], amelyben főleg az M, F, és H proteineket kódoló szekvenciák módosulnak [188]. További krónikus betegségekben (Paget kór, *otosclerosis*, *achalasia*) is felvetették a perzisztáló defektív kanyaróvírusok szerepét [182], azonban az egyébként sikeres vakcinálás elterelte a figyelmet ezen betegségek és a kanyaró kapcsolatának kiterjedt vizsgálatától.

Otosclerosis

A populáció széles rétegeit érinti a halláscsökkenés, amelynek hátterében különböző okok állnak és a különböző eredetű halláscsökkenések különböző terápiás megközelítést igényelnek. A levegőben terjedő, távolból érkező hanghullámokat a dobhártya és a hallócsontláncolat továbbítja a belső fül felé. Fiziológias körülmények között a hanghullámok által keltett rezgések a *stapes* talpánál mintegy 10 nm terjedelmű kilengéseket okoznak, amelyek az ovális ablakon keresztül a belső fülbe továbbítódnak. A *stapes* fixáció (*stapes ankylosis*) a *stapes* talp berögzülését jelenti az ovális ablakba, amely az egész hallócsontláncolat fixációját és vezetékes nagyothallást eredményez. A *stapes* fixáció leggyakoribb oka a primer hallászavarok közé tartozó *otosclerosis* [189]. Az *otosclerosis* a *stapes* talpat, az ovális ablak csontos peremét és belső fül csontos tokját, *oticus capsulát* érinti, a betegség kezdeti stádiumát szivacsos kóros szerkezetű csontképződés jellemzi, míg a késői stádiumban az újonnan keletkezett kóros csontállomány sejtszegénnyé válik, fokozott mennyiségű erősen kalcifikált extracelluláris állománnyal.

A fül-orr-gégészeti gyakorlatban alkalmazott nem invazív vizsgáló módszerek érzékenyen kimutatják a hallócsontláncolati fixációt, azonban maga a *stapes ankylosis* biztosan csak invazív módon, *tympanotomia* során azonosítható, a *stapes ankylosis* hátterében álló *otosclerosis* pedig csak szövettani vizsgálattal állapítható meg kétséget kizáró módon [190]. A nem invazív vizsgálatok során az *otosclerosis* gyanúját felveti a *tinnitus*, a *stapedius* reflex hiánya, a progresszív vezetékes halláscsökkenés, amelyhez kisebb mértékű szenzorineurális halláscsökkenés társul. A légvezetékes és

csontvezetési audiometriai adatok különbségeként adódó csontlégköz megjelenése jellegzetes az otosclerosisban [191]. *Otosclerosis*ban a szenzorineurális halláscsökkenés 2000 Hz frekvencián jelenik meg először markánsan. HRCT (high resolution computer tomography) felvételen az *otosclerosis* gócok is megjelenhetnek [192].

Több etiológiai tényezőt is felvetettek az otosclerosis kialakulásában. A *stapes* fixációs esetek mintegy harmadában családi halmozódást figyeltek meg, amelynek hátterében három különböző lokuszt azonosítottak, azonban az esetek szövettani verifikálása nem történt meg [193]. A súlyosságban és progresszióban az ösztrogének, a progeszteron és a parathormon szerepét azonosították [194]. Ismert *otosclerosis*ban kontraindikáltak a női hormontartalmú készítmények. A parathormon receptorokon keresztül az oszteoblasztok prosztaglandinokat és prosztaciklineket választanak ki, amelyek viszont az oszteoklaszt sejteket aktiválják [195]. A szövettani vizsgálatokban megfigyelt oszteoklaszt funkciójú sokmagvú óriássejtek felvetették syncytium formáló vírusok jelenlétét. Az *otosclerosis* gócok oszteoklaszt sejtjeiben elektromikroszkópos vizsgálatok filamentózus, helikális vírus-nukleokapszidokra emlékeztető struktúrákat tártak fel [196, 197], immunhisztokémiai eljárással kanyaróvírusra specifikus antigéneket mutattak ki [198]. A megbetegedettek *perilympa* mintáiban kanyaróellenes ellenanyagokat tudtak kimutatni, de sem virális antigéneket, sem virális nukleinsavat nem lehetett detektálni [199].

Célkitűzések

Az értekezésben szereplő kísérletes klinikai vizsgálatok közös vonása az, hogy lassan, lappangva kialakuló kórfolyamatokban a molekuláris epidemiológia eszközeivel valamint *in vitro* kísérletes rendszerekben vizsgáltuk perzisztens fertőzések patogenetikai szerepét. Vizsgálatainkat az alábbi három klinikai tématerületen végeztük: papillomavírusok és a cervikális karcinogenezis; herpesvírusok és a *periodontitis apicalis*, morbillivírus és az *otosclerosis*. Ezen tématerületeken belül közvetlen célkitűzéseinket az alábbiakban részletezem:

Humán papillomavírusok (HPV) és cervikális karcinogenezis

- A nukleinsav hibridizáción alapuló Hybrid Capture HPV® rendszer klinikai értékelése és kiegészítése restrikciós fragment hossz alapú tipizálással.
- A HPV kimutatás és további tipizálás szerepe az onkogén kockázat becslésében a cervikális karcinogenezis korai szakaszában
- Kóros citológiai elváltozás mellett milyen időtávon figyelhető meg a HPV fertőzés onkogén kockázata?
- HPV kimutatás prognosztikai értéke CIN léziók műtéti eltávolítása után
- A méhnyak szöveti környezetében kiemelt szerepet játszó IL-10 promotor szakasz polimorfizmusának és epigenetikai szabályzásának vizsgálata
- A HPV-16 onkoproteinek hatásának vizsgálata a non-receptor Src tirozinkinázokra proliferálódó és differenciálódó keratinocitákban.

Humán herpesvírusok és a periodontitis apicalis

- Az endodonto-patogén baktériumok által kiváltott *periodontitis apicalis chronica* kórfolyamatban az Epstein-Barr vírus, a humán cytomegalovírus és a humán herpesvírus 6 jelenlétét és transzkripciós aktivitását összevetni a periapikális léziók méretével, panaszos manifesztációjával
- A periapikális léziókban a gyulladásos folyamatban meghatározó szerepet játszó TNF-alfa és TGF-béta expresszióját transzkripciós szinten összevetni a fenti vírusfertőzésekkel.

Morbillivírus és az otosclerosis

- Morbillivírus előfordulásának a virális RNS-re alapozott vizsgálata klinikailag *otosclerosis*ra gyanús elváltozásokban, valamint szövettanilag verifikált *otosclerosis*ban
- A *otosclerosis*os léziókban a gyulladásos és a csontátépülési folyamatban meghatározó szerepet játszó TNF-alfa expresszióját transzkripciós szinten vizsgálni és összevetni a kórfolyamat aktivitásával.

Vizsgálati módszerek

Klinikai tanulmányok, klinikai minták

Retrospektív vizsgálatokat a laboratórium rutin diagnosztikai tevékenysége során gyűjtött klinikai mintákra alapoztunk. A klinikai adatbázisból gyűjtöttük össze a betegadatokat. A betegadatokat és HPV paraméterek összefüggését keresztmetszeti, eset-kontroll (*IL-10 polimorfizmus, IL-10 promotor metiláció*) vagy longitudinális (*HPV onkogén kockázata a fertőzés természetes lefolyása során és a műtéti eltávolítás után*) módon értékeltük, amelyeket a folyamat kimeneteléig követtük. A *periodontitis* és az *otosclerosis* projektekben prospektív minta- és adatgyűjtést végeztünk és az összefüggéseket keresztmetszeti, eset-kontroll módon értékeltük. A HPV vizsgálatokban exfoliált hámsejteket, a *periodontitis* vizsgálatokban a periapikális granulomákat és impaktált bölcsességfogakat, az *otosclerosis* vizsgálatokban, *stapes* és kortikális csontmintákat gyűjtöttünk. A gyökércsúcsi szövetszaporulatot RNAlater reagensben, az impaktálódás miatt eltávolított, önmagukban ép bölcsességfogakat steril fóliában, az *otosclerosis* mintákat steril Eppendorf csőben gyűjtöttük és -70 °C alatt tároltuk a feltárásig.

Primer sejtek, folyamatos sejtvonalak

Folyamatos *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalakat (HeLa, SiHa, Caski, HT-3, C33A) és az epiteliális eredetű immortalizált HaCaT sejtvonalat DMEM alapú tápfolyadékban tenyésztettünk. A primer humán keratinocitákat szérumentes DM-SFM tápfolyadékban tenyésztettük, akárcsak az LXS_N retrovírus vektorba illesztett HPV-16 E6 és E7 onkogénnel transzdukált keratinocita kultúrákat [200]. A korai passzázsban szaporodó, proliferálódó állapot mellett a differenciálódás hatását is vizsgáltuk, amelyet 1,8 mM-lal megemelt CaCl₂ koncentráció mellett és 10% borjúsérummal kiegészített DMEM tápfolyadékkal értünk el [200]. Perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) vénás vérből izoláltuk Hypaque-Ficoll gradiens centrifugálással.

Nukleinsav feltárás, cDNS előállítás

A sejtvonalakból fenol-kloroformos módszerrel tártuk fel a DNS tartalmat és trizol alkalmazásával az RNS-t. Az alkalikus Hybrid Capture transzport közegbe vett exfoliált hámsejteket ecetsav-alkoholos kicsapással izoláltuk, míg a fiziológiás só alapú transzport közegbe vett exfoliált hámsejteket szilikamembrános izolálással (Roche, Viral Nucleic Acid Kit). Az izolált DNS 5 ug aliquotjainak nátrium-biszulfitos modifikálását a következő elegyben végeztük: 100 ul desztvíz, 11 ul 3M NaOH, 60 ul hidrokinnon, 1000 ul 3,6 M nátrium-biszulfit. 16 óra 55 °C inkubálás után GeneClean Kittel (Qiagen) nyertük vissza a modifikált DNS-t. A bölcsességfog mintákat a steril fóliában fémkalapáccsal törtük össze, majd a törmelékből a pulpaszövetet steril fogászati gyökérkezelő műszerekkel és csipeszekkel távolítottuk el. A biopszia jellegű mintákat (*pulpa, szövet, periapikális granuloma, csontminták a*

fűlből) folyékony nitrogén segítségével porcelánmózsárban homogenizáltuk. A homogenizált mintákból az RNS-t trizol alkalmazásával, a DNS-t szilikamembrános izolálással (Roche, Viral Nucleic Acid Kit) tártuk fel. A RNS-ről cDNS kópia szintéziséhez Enhanced Avian HS (Sigma-Aldrich), High Capacity cDNA (Life Technologies) reverz transzkriptáz vagy rTth enzimet használtunk. Az utóbbi a cDNS PCR amplifikálására is alkalmas volt.

DNS, cDNS, biszulfít modifikált DNS PCR amplifikálása

A célszekvenciákra tervezett oligonukleotid primerek segítségével amplifikáltuk a kiválasztott genomi szakaszokat, a primerekre optimalizált hőmérséklet profillal. Allél-specifikus PCR vizsgálatban külön amplifikációs reakcióban alkalmaztuk az egyik primer két különböző variánsát, amelyek a 3' utolsó nukleotidban különböztek az allélt meghatározó egyedi nukleotid típusú polimorfizmusnak megfelelően. Az amplifikációt Taq polimeráz enzimmel végeztük. A vizsgált minta alkalmasságát PCR amplifikációra háztartási gének (béta-globin, GAPDH, RPLP2) amplifikációjával ellenőriztük. Kétlépcsős (nested) PCR alkalmaztunk, amikor a vizsgált célszekvenciát jelenléte alacsony kópiaszámban volt várható. A konvencionális végpontos PCR amplifikáció eredményét agaróz gélelektroforézis segítségével vizualizáltuk és a molekulaméret alapján azonosítottuk. További azonosítást biztosított a PCR termék restrikciós fragmenthossz analízise és a szekvenálása a Sanger módszer alapján. A célszekvencia vagy a cDNS mennyiségi meghatározását valós idejű detektálással, SYBR Green PCR Mastermix vagy TaqMan PCR Mastermix (Life Technologies) polimerázzal ABI Prism 7500 PCR készülékben végeztük. A TaqMan polimerázhoz a célszekvenciára tervezett primer-próba mixeket (Life Technologies) használtuk. Adott szekvencia relatív mennyiségét $\Delta\Delta CT$ módszerrel fejeztük ki. Populációk közötti összehasonlítást ΔCT módszerrel végeztünk, minden egyes mintában meghatároztuk a célszekvencia és a háztartási gén CT értékének különbségét, majd ezen ΔCT értékek eloszlását, medián értékét hasonlítottuk össze a különböző csoportok között.

Klónozás plazmidvektorokba és transzfektálás eukarióta sejtbe

A PCR termékek klónozását plazmidvektorba T/A ligálással végeztük. A Taq polimeráz 3' túlnyúló adenint szintetizál a PCR termékek végére. A plazmidot olyan restrikciós enzimmel hasítottuk, amelyik tompavéget eredményez, majd Go Taq polimerázzal (Promega) 3' túlnyúló timin illesztettünk a tompavégekre. A vektor és az inszert így egymáshoz kompatibilis ragadós véget kapott, amelyek révén T4 DNS ligázzal kovalensen egymáshoz ligáltuk őket. A ligálási terméket *E. coli* baktériumba transzformáltuk és felszaporítottuk, majd kiválasztottunk egy olyan klónt, amelyik a tervezett módon hordozta az inszert szekvenciát. A klón a rekombináns plazmiddal együtt felszaporítottuk, majd nagy mennyiségben visszaizoláltuk a rekombináns plazmidot.

Az epiteliális eukarióta sejtvonalakat sejtenyésztő Petri-csészében tenyésztettük és a rekombináns plazmidot 10 ug mennyiségben transzfektáltuk Lipofectamin 2000 (Invitrogen) reagens

alkalmazásával. 48 órával később a rekombináns plazmid aktivitását luciferáz teszt (Luciferase Assay, Promega) alkalmazásával mértük.

Fehérje izolálás, Western-blot, array-blot

Sejtenyészeteket ill. transzfektált sejtenyészeteket tripszinnel választottunk fel a tenyésztőflaskák aljáról. A teljes fehérjetartalmat proteáz gátló (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) és foszfatáz gátló 1mM NaF jelenlétében lízis pufferben vettük fel (150mM NaCl, 1%v/v NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,5%w/v Na-dezoxikolát, 0,1%w/v SDS, 0,01 %w/v Na-azid, 1 mM EDTA). 15 perc 4°C-os inkubálás után 15 perc 13000 g 4°C-os centrifugálás után a fehérjetartalmú felülúszót használtuk.

A felülúszókat Laemmli pufferrel denaturáltuk 95°C-on 5 percig, majd 10 % SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel molekulaméret alapján szétválasztottuk és a kialakult molekula eloszlást nitrocellulóz membránra vittük át elektromos térerő segítségével. A membrán aspecifikus fehérjekötését 3% BSA oldattal blokkoltuk, majd az elsődleges antitestekkel és a következő lépésben tormaperoxidázzal jelölt másodlagos antitestekkel reagáltattuk. Az egyes lépések között 3x 10 perc mosást végeztünk PBS-0,05% Tween20 oldattal. Az immunreakciók eredményeként kialakuló kemilumineszcens (Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate, Pierce) sávokat mutattuk ki röntgen filmen detektálva.

Az Src kináz család egyedi foszforilációs vizsgálatára Human Phosphokinase Array Kit-et (Proteome Profiler Array, R&D Systems) alkalmaztuk, amely szendvics rendszerű detektálást biztosít. Az egyes pozíciókba leköttődött foszforilált fehérjéket kemilumineszcens detektálással (l. fentebb) mutattuk ki és denzitometriás méréssel határoztuk meg az egyes foltreakciók intenzitását.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a klinikai tanulmányokban nem parametrikus statisztikai módszerekkel végeztük, a keresztmetszeti elemzéseket Yates korrigált khi-négyzet, Fisher exact statisztikákkal ill. egy- és több változós logisztikus regressziós módszerrel esélyhányados (odds ratio) és a hozzátartozó 95% megbízhatósági tartomány meghatározásával végeztük. Folyamatos, nem normál eloszlású változók eloszlását non-parametrikus Mann-Whitney tesztel hasonlítottuk össze. A longitudinális elemzéseket egy- és több változós Cox regressziós módszerrel relatív kockázat és a hozzátartozó 95% megbízhatósági tartomány meghatározásával végeztük. Az *in vitro* kísérletes munkában mérési adat szórását, standard hibáját határoztuk meg, valamint T-próbával vizsgáltuk a szignifikanciát.

Eredmények és megbeszélés

Humán papillomavírusok (HPV) tipizálása

(Kónya et al 2000 [201])

A nagy nemzetközi epidemiológiai felmérések alapján a fontosabb anogenitális HPV típusok megismerése után néhány éven belül körvonalazódott a magas onkogén kockázatú (high-risk) papillomavírusok csoportja. Ugyan ebben az időben a kóroki szerep formális bizonyítása még nem zajlott le, a világszerte végzett felmérések egységesen, kétséget kizáró módon jelezték a magas onkogén kockázatú HPV típusok jelenlétét, biomarker szerepét a cervikális karcinogenezisben a kezdeti stádiumoktól az invazív méhnyakrákkal bezárólag [202-204]. A felmérések, tanulmányok a rutin méhnyakszűrésben szerzett tapasztalatokra alapozva indultak el és a HPV típusok előfordulását a szűrés során kiemelt *citológiai atípia* vonatkozásában értékelték. A rák megelőző léziókra utaló HSIL és AIS onkocitológiai eredmény igen nagy arányban párosul magas onkogén kockázatú típus jelenlétével. Az LSIL többnyire alacsony kockázatú típusok fordulnak elő, de kis százalékban ott szokott lenni a magas onkogén kockázatú HPV is. Az atípusos laphám (ASC) /atípusos mirigyhám (AGC) kategória patológiai diverzitása a HPV fertőzés megjelenésében is tükröződik, jelentős részük HPV-tól független elváltozás, a fennmaradó rész többnyire magas onkogén kockázatú HPV típust hordoz, de akár alacsony kockázatú HPV is lehet a háttérben.

Minél több anogenitális HPV típust ismertek meg és minél jobban feltárták, hogy melyek fordulnak elő onkológiai jelentőségű elváltozásokban, annál hangsúlyosabban felmerült a kérdés, hogy ezt a biodiverzitást a klinikai gyakorlat számára jól kezelhető és a finanszírozás szempontjából felvállalható módon interpretálják. Az HPV szerkezetéről és osztályozásáról szóló bevezetésben részleteztem, hogy a konzervatív L1 nukleinsav szekvenciákon [5, 205] alapuló módszerek jelentették a megoldást az anogenitális típusok átfogó detektálására.

A magas onkogén kockázatú HPV csoport éppen az onkológiai jelentőségű léziókban megfigyelt halmozódása alapján körvonalazódott és a rutin laboratóriumi szűrés számára elegendő volt és ma is elegendő a HPV típusok alacsony és magas kockázatú csoportjainak megkülönböztetése. Az első *in vitro* diagnosztikai célra validált kereskedelmi forgalmú HPV teszt, a Digene's Hybrid Capture® teszt kidolgozása Lőrincz és mtsai nevéhez fűződik [205-208]. A teszt magas kockázatú típusokra specifikus próbakeverékkel végzett nukleinsavhibridizáció és kemilumineszcens jelamplifikáció biztosítja a szükséges HPV spektrumot, szenzitivitást és fajlagosságot.

Kutatási cél:

Nukleinsav hibridizációs elven működő Digene Hybrid Capture HPV® tesztre kiegészítő és analitikai értékelésre alkalmas HPV tipizálási eljárás fejlesztése [201]

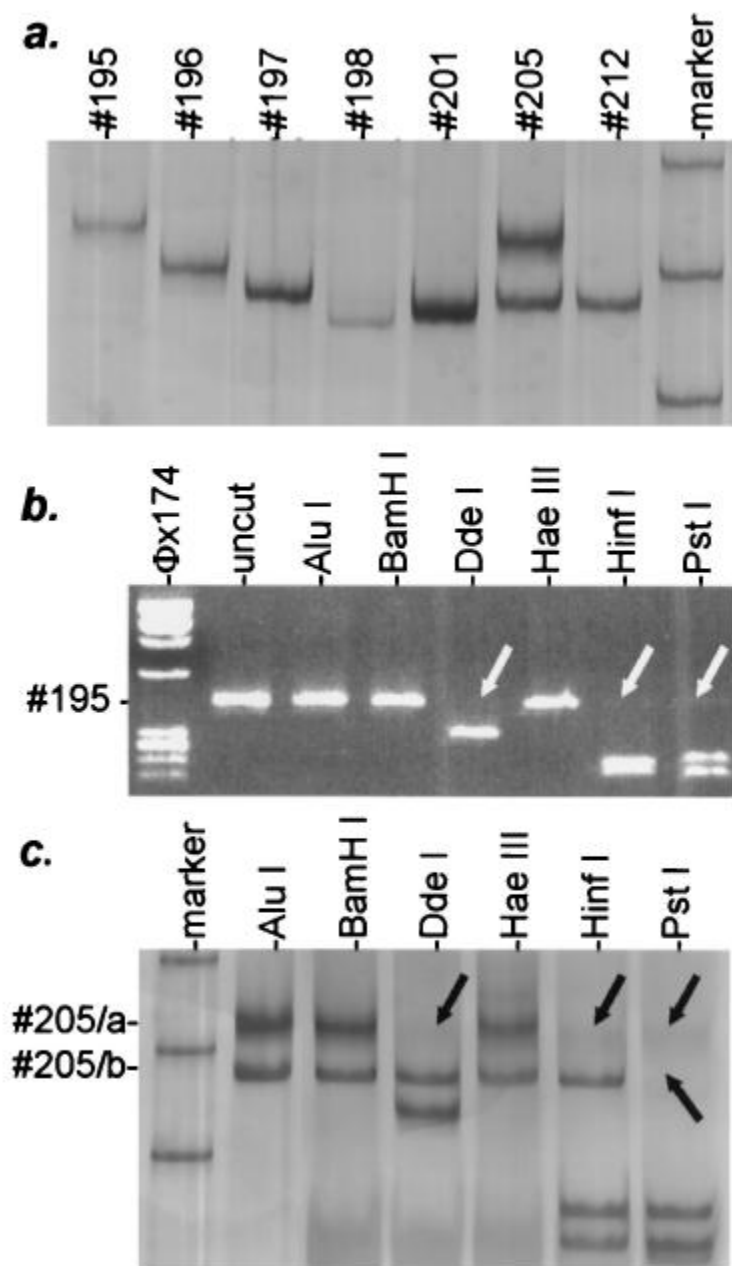
Klinikai minták. Az Orvosi Mikrobiológiai Intézetbe rutin diagnosztikai vizsgálatra érkezett első 570 exfoliált cervikális hámsejt mintából 145 bizonyult HPV pozitívnak. A vizsgálatot *Digene Hybrid Capture®* teszttel a gyártói utasításnak megfelelően végeztük el. A beküldő diagnózisok onkológiai szempontból bizonytalan vagy gyanús, citológiai vagy kolposzkópos elváltozásokra utaltak

Mintafeldolgozás. A minták feldolgozását a rutin diagnosztikus módszerhez adaptáltuk, amelyben a feltárt nukleinsav alkalikus közegben volt denaturálva és ilyen formában -20 °C-on tartós tárolását a módszer megengedte. Az adott közegből a pH semlegesítésre és a DNS kicsapásra egy lépéses alkoholos acetátos módszert dolgoztam ki, 300 ul Hybrid Capture mintához 60 ul jégecetet és 750 ul 96% etanolt adtunk, majd -20 °C-on segítettük elő a kicsapást, végül percipitátumot 12000× g 15 perc centrifugálással ülepítettük. Minden feldolgozott minta PCR detektálásra alkalmasságát az endogén kontrollként szolgáló béta-globin genomi szekvenciák PCR amplifikációjával ellenőriztük.

Eredmények:

A 145 Hybrid Capture HPV pozitív feltárt mintából 16-t zártunk ki a további vizsgálatból, mert az endogén béta-globin szekvenciákat nem tudtunk amplifikálni PCR eljárással. A további vizsgálatra alkalmas 129 mintából 102-ben magas onkogén kockázatú, 15-ben alacsony kockázatú HPV-t mutatott ki a Hybrid Capture HPV teszt, míg a maradék 12 mintában mind magas onkogén kockázatú, mind alacsony kockázatú HPV jelet kaptunk.

A PCR amplifikálásra alkalmas 129 mintát az MY09-MY11 konszenzus HPV primerek segítségével amplifikáltuk, amely alkalmas az addig ismert és a legtöbb azóta megismert anogenitális HPV típus PCR amplifikálására. A különböző anogenitális típusokról 449, 452, 455 vagy 458 bp PCR termék képződik, amelyeket a termék belső szekvenciája alapján lehet megkülönböztetni. A keletkezett termékek szekvencia diverzitásának ellenőrzésére első lépésben a nem-denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis azon tulajdonságát használtuk ki, hogy az agaróz gélelektroforézissel szemben nem csak a termék hossza, hanem a nukleotid szekvenciája is befolyásolja az elektroforetikus mobilitást. Ugyanez a tulajdonság a PCR termék méretének csak közelítő becslését teszi lehetővé, a jól optimalizált PCR körülmények között képződő homogén PCR termék festés után jól azonosítható diszkrét sáv formájában jelenik meg. Az **7. ábra** szemléltetett módon a szekvenciából adódó mobilitás különbségek alkalmasak voltak a mintákban előforduló HPV típusok diverzitásának igazolására és kettős vagy hármas HPV fertőzések azonosítására is. Az egymást követő mintákban észlelt HPV diverzitás alapján nagy valószínűséggel ki lehetett zárni a PCR detektálás egyik csapdájának számító keresztkontaminációt.



7. ábra Anogenitális humán papillomavírusok restriktációs fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) tipizálása. (a) Az MY09-MY11 konszenzus primerekkel amplifikált közel azonos hosszúságú (452 ± 6 bp), de eltérő szekvenciájú PCR termékek mobilitása nem denaturáló poliakrilamid gélben (HPV-33, HPV52, HPV-16, HPV-56, HPV-6, HPV-16+33, HPV-18) (b) simplex fertőzés RFLP tipizálása agaróz gélben (c) multiplex fertőzés RFLP tipizálása poliakrilamid gélben.

3. táblázat MY11-MY09 amplimerek restrikciós fragmenthossz polimorfizmuson (RFLP) alapuló tipizálása

<i>bin. kód</i>		HPV típus	azonos bináris kódú HPV típusok elkülönítése	
<i>A*</i>	<i>B*</i>		<i>enzim</i>	<i>fragmenthossz különbségek (bp)</i>
0	4	16, 26	<i>Pst I</i>	<u>HPV16</u> : 246,206 vs. <u>HPV26</u> : 351,102
0	5	59		
0	7	62		
1	1	61, 106	<i>Hae III</i>	<u>HPV61</u> : 220,211 vs. <u>HPV106</u> : 209,127,108
1	2	82		
1	5	81		
2	7	11, (43)**	<i>Hae III</i>	<u>HPV11</u> : 217, 124, 108 vs. (<u>HPV43</u> : 331, 124)**
3	1	69, 83v	<i>Hae III</i>	<u>HPV69</u> : 223,183,49 vs. <u>HPV83v</u> : 383,69
3	2	68		
3	3	54, 70	<i>Alu I</i>	<u>HPV54</u> : 172, 167, 113 vs. <u>HPV70</u> : 296, 159
3	5	83		
3	7	70v, 102	<i>Pst I</i>	<u>HPV70v</u> : 246,209 vs. <u>HPV102</u> : 359,93
4	1	44		
4	2	(91)**		
4	3	6, 55, 73, 114	<i>Dde I</i>	<u>HPV6</u> : 382 vs. <u>HPV55</u> : 112, 111, 101, 85 vs. <u>HPV73</u> : 220, 142, 90 vs. <u>HPV114</u> : 246,155
4	4	57		
4	5	34, 35	<i>Pst I</i>	<u>HPV34</u> : 253, 179 vs. <u>HPV35</u> : 426
4	6	33		
4	7	31		
5	0	90		
5	1	72		
5	2	82		
5	3	53		
5	4	73		
5	5	52, 56	<i>Pst I</i>	<u>HPV52</u> : 419 vs. <u>HPV56</u> : 246, 203
5	6	39, 58	<i>Pst I</i>	<u>HPV39</u> : 330, 125 vs. <u>HPV58</u> : 216, 207
5	7	67, 71	<i>Hinf I</i>	<u>HPV67</u> : 234, 215 vs. <u>HPV-71</u> : 346, 106
6	0	40		
6	1	89		
6	4	18, 45	<i>Dde I</i>	<u>HPV18</u> : 432 vs. <u>HPV45</u> : 324, 131
6	7	13, 64, 87	<i>Pst I</i>	<u>HPV13</u> : 246,209 vs. <u>HPV64</u> : 428 vs. <u>HPV87</u> : 351,101
7	0	85		
7	1	51		
7	2	42		
7	3	32		
7	4	66, 97	<i>Dde I</i>	<u>HPV66</u> : 291,158 vs. <u>HPV97</u> : 362,93
7	7	86		

*1-2-4 bináris kód az MY09-MY11 fragmentben AluI, BamHI és DdeI (A) valamint HaeIII, HinfI és PstI (B) hasító hely előfordulása alapján. ** MY09 primer valószínűleg nem amplifikálja

A HPV típus meghatározáshoz RFLP (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) alapú tipizálást dolgoztam ki. A kifejlesztésnél alapvető szempont volt, hogy a fragmentméret meghatározás pontatlansága minél kevésbé befolyásolja a tipizálást. Nagy sorozatú vizsgálatokban, az elterjedten alkalmazott paraméterek mellett agaróz gélben 20-50 bp pontossággal lehet fragmenthosszat meghatározni, míg poliakrilamid gélben gyakorlatilag nem lehet. A módszer robusztusságát úgy biztosítottam, hogy az akkor ismert mintegy 50 típushoz 6 olyan restrikciós enzimet kerestem, amelyhez restrikciós hasítóhely a típusok kb. felének MY szakaszában fordult elő. A típusok között a restrikciós hasítóhelyek teljesen véletlenszerű eloszlását feltételezve $2^6=64$ különböző típus elvi azonosítását tette lehetővé a 6 restrikciós enzim csak az alapján, hogy történt-e hasítás vagy sem. Az irodalomból ismert szekvencia adatok alapján az ismert típusok restrikciós fragment méreteit meghatároztuk egyenként a 6 enzimre. Az enzimeket két hármas csoportra osztottam és ezen enzimhármasokra bináris 1-2-4 kódrendszerrel határoztam meg minden egyes típusra, hogy van-e hasítóhelye vagy sem az MY szakaszban. Az első enzim hasítása 1 pontot jelent, a másodikiké 2 pontot, a harmadiké 4 pontot, ha több is hasít, akkor a pontok összegződnek, így az enzimhármas hasítási képességét 0,1,2, ... 7 értékekkel lehet jellemezni. Az **3. táblázat** az enzimhármasok növekvő 1-2-4 kódjainak sorrendjében mutatja be az egyes típusok MY szakaszainak hasíthatóságát. Látható, hogy a legtöbb típus ilyen módon egyértelműen azonosítható. Maradtak olyan típusok is, amelyeknek más típusokkal azonos 1-2-4 kódja volt, ilyenkor azt a restrikciós enzimet kerestük, amelynek MY fragmenthossz adatai a legnagyobb mértékben különböztek az egyébként azonos 1-2-4 kódú típusok között. Példaként a HPV-52 és HPV-56 magas onkogén kockázatú típusokat lehet felhozni, amelyeket a Pst-I fragmentek mérete alapján lehet jól megkülönböztetni (**3. táblázat**). A kidolgozott módszert jól lehetett alkalmazni mind agaróz gélen kapott restrikciós profil elemzéséhez, mind többszörös fertőzésben a fertőző típusok meghatározásához poliakrilamid gélben (**7. ábra**). A módszer alkalmasnak bizonyult hármas HPV fertőzés (HPV-31, -56, -70) kimutatására olyan mintapárból, amely ugyanazon betegről 1 hónap különbséggel levett két cervikális mintából állt.

A Hybrid Capture HPV tesztnek akkor pozitív az eredménye, amikor vagy az alacsony kockázatú (low risk, „LR”) próbakeverékkel, vagy a magas kockázatú (high risk, „HR”) próbakeverékkel vagy mindkettővel reagált a feltárt minta (**4. táblázat**). A Hybrid Capture HPV tesztel kapott pozitív eredményeket összevetettük a PCR-RFLP tipizálással. Mind a 129 mintában kimutatható és tipizálható volt a fertőzést okozó HPV típus, 119 mintában (93%) olyan típust lehetett kimutatni, amelyre a gyártó validálta a tesztet, míg 10 mintában (7%) olyan típusokat lehetett csak kimutatni, amelyek kereszthibridizáltak a próbakeverék valamelyik tagjával. A hibridizációs eljárás diszkriminatív képességét azon minták alapján ítéltük meg, amelyekben vagy csak alacsony (**4. táblázat** „LR pozitív” oszlop), vagy csak magas kockázatú HPV (**4. táblázat** „HR pozitív” oszlop) fertőzést jelzett a hibridizáció. Az előbbi csoportban (n=15) minden esetben a teszt leírásnak megfelelő alacsony kockázatú típusokat igazolt vissza a PCR-RFLP tipizálás, míg az utóbbi csoport 102 mintájából

kilencben csak kereszthibridizáló típus amplifikálódott a következő megoszlásban: HPV-53 (2 minta), HPV-58 (2 minta), HPV-66 (3 minta), HPV-81, HPV-82 (egy-egy minta). A Hybrid Capture HPV tesztben járulékosan detektált típusokat a PCR-RFLP módszer mellett DNS szekvenálással is megerősítettük. A Hybrid Capture HPV teszt későbbi verziójában a HPV-58 próba már megjelent a magas kockázatú próbakeverékben. Későbbi epidemiológiai elemzések [53] alapján a HPV-53 és HPV-66 típusokat lehetségesen onkogénként osztályozták, a HPV-82-t magas onkogén kockázatúként, míg a HPV-81-t alacsony kockázatúként.

4. táblázat. Az PCR-RFLP tipizálás és a Hybrid Capture HPV eredmények egyezése

PCR RFLP eredmény	Hybrid Capture Tube teszt eredménye		
	LR [#] pozitív	LR [#] +HR [#] pozitív	HR [#] pozitív
<i>LR típus</i>			
HPV-6	11	1	
HPV-11	3		
HPV-44	1		
<i>csak egy HR típus</i>			
<i>detektálható</i>			
HPV-16		3	46
HPV-18		1	6
HPV-31		2	10
HPV-33			5
HPV-35			2
HPV-45			2
HPV-52			6
HPV-56			3
egyéb		1	9
		(HPV-62)	(HPV-53, -58, -66, -81, -82)
multiplex fertőzés		4*	13**
összesen	15	12	102

* HPV-6/16, HPV-6/45, HPV-16/31, HPV-16/52

**HPV-18/33, HPV-18/58, HPV-31/52, HPV-33/35, HPV-52/56, HPV-16/31 (3 mintában), HPV-16/33 (3 mintában), HPV-31/56/70 (egy beteg 2 mintájában, melyeket 1 hónap különbséggel vettek le)

[#] LR: alacsony kockázatú, HR: magas onkogén kockázatú HPV

A Hybrid Capture HPV teszt 12 mintában detektált kettős pozitivitást (**4. táblázat** „LR+HR pozitív” oszlop), de PCR-RFLP tipizálással csak kettőben lehetett ténylegesen kimutatni magas onkogén

kockázatú és alacsony kockázatú HPV típusok koinfekcióját. Megvizsgáltuk, hogy a Hybrid Capture kettős pozitív minták hibridizációs jelerőssége milyen mértékben függ össze az észlelt eltérésekkel (**5. táblázat**). A Hybrid Capture HPV tesztben a hibridizációs szignál relatív érték, amelyet a kalibrátor három párhuzamos mérésének átlagához viszonyítanak. Abban a nyolc mintában, amelyben a magas kockázatú hibridizációs jel erőssége elérte vagy meghaladta az alacsony kockázatú hibridizációs jelét, csak onkogén HPV típust tudtunk kimutatni, míg az alacsony kockázatú szignál dominanciáját mutató négy mintában mindig ott volt az alacsony kockázatú típus, de két esetben nem lehetett igazolni az onkogén típus jelenlétét. Ebben a csoportban a HPV-62 volt a kereszthibridizáló típus.

5. táblázat **Hybrid Capture HPV tesztben kettős (LR+HR) pozitív minták PCR RFLP tipizálása**

minta	HPV típus (PCR RFLP alapján)	Hibridizációs jel erőssége (minta RLU / kalibrátor RLU*)		
		LR próba (A)		HR próba (B)
#294	6	10,0	>	1,8
#61	6/16	3,7	>	1,3
#191	6/45	159,6	>	1,8
#488	62	24,4	>	4,1
#17	16	6,7	<	7,0
#116	16	2,4	<	22,4
#257	16	38,8	<	201,9
#34	16/31	26,9	<	192,2
#492	16/52	61,3	<	81,4
#411	18	12,8	<	83,5
#271	31	1,7	<	37,1
#368	31	2,5	<	180,4

* RLU: relatív lumineszcencia egység. Minden vizsgálati sorozatban három párhuzamos mérés történt mind az alacsony, mind a magas kockázatú kalibrátorral.

LR: alacsony kockázatú, HR: magas onkogén kockázatú HPV

Megbeszélés

A Hybrid Capture HPV teszt és a PCR-RFLP tipizálás között igen jó, de nem 100%-os egyezést találtunk, amelyet a klinikai felhasználás szempontjából érdemes elemezni. A méhnyakszűrés szempontjából az elsődleges kérdés, hogy onkogén HPV típus jelen van-e a folyamatban. Eredményeink alapján Hybrid Capture HPV teszt magas kockázatú próbakeveréke a validált HPV típusokon túl további HPV típusokat (53, 58, 66, 81, 82) is felismert, amelyek közül egyedül a HPV-81 nem tekinthető onkogén típusnak [53, 54, 209]. Két olyan további eset volt, amelyben a Hybrid Capture HPV teszt mind alacsony, mind magas kockázatú típust jelzett, de csak a PCR RFLP csak alacsony kockázatú típust igazolt vissza. Összességében 97%-ban (111/114) igazolódott, hogy a teszt valóban jól jelezte onkogén HPV típus jelenlétét. A maradék három esetben a Hybrid Capture HPV teszt a *biztonságos oldal felé tévedett*, nem onkogén HPV mellett is megjelent a magas kockázatú típust jelző gyenge hibridizációs szignál. A Hybrid Capture HPV teszt későbbi verziójában is kimutatták a kimutatott HPV típusok spektrumának kereszthibridizációból eredő bővülését [210].

A méhnyakszűrés során költséghatékonysági szempontból megengedett olyan tesztek használata, amelyek csak az onkogén HPV típusokra szűrnek [211]. Ha olyan HPV kimutatási eljárást alkalmaz a laboratórium, amely a magas kockázatú mellett alacsony kockázatú HPV fertőzéseket is azonosít, akkor diagnosztikai szempontból fel kell készülni a kizárólag alacsony kockázatú pozitívítás, valamint az alacsony kockázatú plusz magas kockázatú kettős pozitívítás interpretálására. Az előbbi ugyan önmagában nem jár onkogén kockázattal, de ugyanúgy szexuális úton terjed és az egyik szexuális úton terjedő fertőzés olyan életvitelre utal, amely fokozza bármely másik szexuális fertőzés pl. egy onkogén HPV fertőzés esélyét. A Hybrid Capture kettős pozitívításban az eredményeink szerint az onkogén HPV fertőzést kell figyelembe venni az teszteredmény interpretálásánál.

Következtetés

A nukleinsav hibridizáción alapuló Hybrid Capture HPV® rendszer hatékonyan kiegészíthető PCR amplifikációs és restrikciós enzimes tipizálással. A hibridizációs körülmények a tesztben validált HPV típusokon túl további HPV típusok kimutatására is alkalmasak. Az ebből adódó típusbővülés olyan elhanyagolható mértékben érinti az onkogén és nem onkogén HPV típusok elkülönítését, ami nem befolyásolja az eredmények klinikai interpretációját.

Humán papillomavírus (HPV) kimutatás és tipizálás jelentősége a méhnyakszűrésben

(Szőke et al 2003 [212], Hernádi et al 2006 [213].)

A DNS alapú detektálás szokásos technikai paraméterein túl, a HPV detektáló módszerek technikai értékelésében további paraméterek szerepe is felmerül. Ezek alapvetően a mikroorganizmus diverzitásából adódnak, számos homológ, de szekvenciában különböző HPV típust kell lefedni a detektáló eljárásnak megfelelő érzékenységgel. A kimutatás fajlagossági követelménye, hogy az onkogén HPV csoporton kívül eső HPV és egyéb mikroorganizmusok jelenlétében ne alakuljon ki álpozitív eredmény. Az említett követelményeket technikai értelemben csak kompromisszumos módon lehet összeegyeztetni a rutin kimutatás nagy áteresztőképességű és jól standardizálható igényével. Ilyen kompromisszum az általunk [201] és mások által [210] is megfigyelt keresztreaktivitás a HPV típusok kimutatásában. Adott HPV detektáló eljárás analitikai paramétereinek összessége alapozza meg az eljárás diagnosztikus teljesítményét. Az ilyen kérdéseket klinikai vagy epidemiológiai megfigyelésekben lehet tanulmányozni és megválaszolni. A HPV diagnosztikai alapkérdése, hogy milyen hatékonyan jelzi előre vagy zárja ki onkológiai folyamat kockázatát.

Kutatási cél:

A HPV kimutatás és tipizálás szerepe az onkológiai kockázat megítélésében

Klinikai minták. Ebben a tanulmányban is olyan exfoliált cervikális hámsejt mintákat vizsgáltunk, amelyeket rutin diagnosztikai vizsgálatra küldtek be az Orvosi Mikrobiológiai Intézetbe. A minták feldolgozása az előző alfejezetben leírtak szerint történt, azaz virológiai státuszra vonatkozóan rendelkezésre álltak a PCR-RFLP módszerrel végzett tipizálás [201] és a rutin Hybrid Capture eredmények. Az utóbbiak az alacsony és magas onkogén kockázatú besorolás mellett a hibridizációs jelerősség alapján a vírusterhelésre helyettesítő becslést adnak. A Hybrid Capture HPV tesztben a lumineszcens hibridizációs jel egységét 10 pg/ml koncentrációjú HPV-16 DNS genomhoz viszonyítják, függetlenül attól, hogy a klinikai mintában HPV-16 vagy egyéb HPV típus fordul elő.

Retrospektív longitudinális elemzés. A tanulmány a Debreceni Egyetem Női Klinika járóbeteg méhnyakszűrésén alapult. A tanulmány idején érvényes szakmai szabályok alapján a HPV diagnosztika a szekunder szűrés része volt, azaz olyan citológiai vagy kolposzkópos elváltozások esetén volt indokolt kérni a HPV kimutatást, amelyekben egyértelműen sem kizárni, sem megerősíteni nem lehetett onkológiai jelentőségű folyamatot. A tanulmány idején a nőgyógyászati gyakorlatban a Papanicolaou citológiai osztályozás volt általánosan elterjedve, Bethesda klasszifikáció szerinti eredmény elvétele fordult elő. Az elemzésben fiziológiás citológiai státuszként soroltuk a P1 és P2 kategóriát, míg a P3 kategória akkoriban már eléggé heterogénen használt alkategóriáit (P2-3, P3?, P3a) egységesen, kóros citológiai atípiaként vettük figyelembe (enyhe, közepes, súlyos *dyskariosis*).

Citológiai elváltozás hiányában olyan kolposzkópos elváltozások miatt kértek HPV kimutatást, mint mozaik, pontozottság, ecetsav pozitivitás.

Az adott betegpopuláció és az adott nőgyógyászati gyakorlat egy olyan nyomon követéses longitudinális tanulmány elvégzését tette lehetővé, amelyben a *cervix uteri* fenti elváltozásaira jellemző kórlefolyást követtük a HPV státusz függvényében. A vizsgálati kohorszba 455 olyan nőbeteg adatait vettünk be, akiknél HPV vizsgálatot végeztünk 1997 május és 1999 december között citológiai vagy kolposzkópos elváltozások miatt, a HPV vizsgálatot követően kontroll vizsgálatokon megjelentek és anamnézisükben nem szerepelt *cervicalis intraepithelialis neoplasia* (CIN) vagy súlyosabb méhnyaki elváltozás. A nőgyógyászati státuszra vonatkozó adatokat a klinikai informatikai rendszerből gyűjtöttük össze, nulla időpontnak vettük a HPV vizsgálatot indikáló citológiai vagy kolposzkópos elváltozás első detektálását. Az adatok gyűjtése prospektív módon folyt az utolsó kontroll vizsgálatig (ha beteget konzervatív módon követte a nőgyógyász), vagy a sebészi kimetszésig. A konzervatív nyomon követéssel az elváltozás regressziójára, javulására vagy gyógyulására lehetett következtetni, a sebészi úton vett biopsziából pedig a szövettani eredményt vettük figyelembe. Így a tanulmány végponti paramétere az onkológiai jelentőségű, legalább közepes fokú CIN (CIN2+) verifikációja volt. A statisztikai elemzést egy- és több változós Cox regressziós módszerrel relatív kockázat és a hozzátartozó 95% megbízhatósági tartomány meghatározásával végeztük.

Eredmények:

A vizsgálati kohorszban a médian életkor 32 év volt (18-61 év), 427 nőbetegnél a cervikális atípiya vagy lézió felismerését követő 6 hónapon belül megtörtént a HPV vizsgálat, míg 28 nőbetegnél ez 6 hónapon túl történt. A Hybrid Capture HPV teszt 152 esetben magas kockázatú, 23 esetben alacsony kockázatú, míg 16 esetben vegyes (kettős pozitív) HPV fertőzést mutatott ki. A PCR-RFLP módszeren alapuló genotipizálás eredményét a **6. táblázat** mutatja be. Az utóbbi 16 betegben a genotipizálás minden esetben kimutatott magas onkogén kockázatú fertőzést, de csak 5 esetben multiplex fertőzést és abból is csak háromban volt alacsony kockázatú a HPV társfertőzés. Ezért a további analízisben a Hybrid Capture HPV kettős pozitív betegeket és a csak magas kockázatú HPV fertőzést mutató betegcsoportot egyesítettük (n=168), amit a korábbi szakirodalom klinikailag is alátámasztott [214]. A Hybrid Capture HPV teszt alapján csak alacsony kockázatú HPV típussal fertőzött 23 betegben mintájában korábbi tapasztalataink alapján [201] nem végeztünk genotipizálást.

6. táblázat Cervicalis intarepithelialis neoplasia (CIN) előfordulása a beválogatáskor észlelt HPV és citológiai státusz szerint

citológia:	nem kóros		atípiás		CIN2+ progresszió
	beteg	CIN (CIN2+)	beteg	CIN (CIN2+)	
HPV státusz					
HPV-negatív*	93	1 (0)	171	7 (3)	0.01
LR-HPV*	17	-	6	1 (1)	0.04
HR-HPV*	37	2 (2)	131	77 (69)	0.41
(geno)típusok:					
16	10		59	49 (43)	0.62
18	4	1 (1)	3	2 (2)	0.43
31	2		13	5 (4)	0.27
33	2		14	5 (5)	0.31
35	2		3	1 (1)	0.20
45			1	1 (1)	1.0
51			1	1 (1)	1.0
52	1		3	1 (1)	0.25
53			3	1 (1)	0.33
56			2	1 (1)	0.50
58			2		0
66	2		3		0
72	1				0
multiplex	6 ⁺	1 (1)	13 ⁺⁺	5 (5)	0.26
nem tipizálható	7		11	5 (4)	0.22

CIN2+: CIN-2 vagy súlyosabb szövettani eredmény

* Digene's Hybrid Capture Tube Test eredmények (LR-HPV: alacsony kockázatú HPV, HR-HPV magas kockázatú HPV fertőzés 152 esetben, vegyes fertőzés 16 esetben)

⁺ multiplex fertőzés: HPV-16/31, -16/52, -18/33, -31/56, -33/54, -45/6, -52/56,

⁺⁺ multiplex fertőzés: HPV-16/31 (2 eset), -16/33 (2 eset), -16/6, -16/52, -16/53, -18/58, -31/52, -33/66, -45/6, -56/55, -58/6

A nyomon követett betegekben a szövettani vizsgálat 13 esetben CIN-1, 31 esetben CIN-2, 19 esetben CIN-3, 23 esetben *carcinoma in situ* (CIS) és 2 esetben mikroinvazív *carcinoma* elváltozásokat igazolt. Itt kell megjegyezni, hogy a CIN-3 és a CIS között ma a szakirodalom nem tesz különbséget, azonban az elemzéshez felhasznált szövettani eredményekben még tükröződött az a korábbi hagyomány, mely szerint a CIN-3-ban a legfelső hámréteg morfológiailag még nem látszott neopláziásnak, míg a CIS-ben a neoplázia a hám teljes vastagságában jelen volt. Abban a betegcsoportban, amelyben a citológiai atípiá háttérében magas onkogén kockázatú HPV fertőzés állt, 58,7%-os arányban alakult ki CIN, amelynek többségében – a teljes csoportra vonatkoztatva 52,6%-ban – az onkológiai jelentőségű legalább közepes fokú CIN (CIN-2+) elváltozás állt.

A citológiai és HPV státusz alapján elkülönített betegcsoportokban különböző volt a koreloszlás. A legmarkánsabb életkor-különbség a magas kockázatú HPV fertőzés mellett és az attól függetlenül kialakult citológiai atípiás csoport között volt (médián életkor 31 ill. 38 év $p < 0,001$). A normál citológiai eredmény mellett mind HPV fertőzött, mind a HPV fertőzéstől mentes betegek koreloszlása hasonló volt (médián életkor 26 ill. 28 év, $p = 0,59$). A fenti eredmények jól tükrözik azt az általános megfigyelést, hogy a HPV fertőzések a huszonévesek között érik el a legmagasabb arányt és azt is, hogy az életkor előrehaladtával nagyobb eséllyel transzformálja a fertőzés a gazdasejtet.

Epidemiológiai értelemben az életkor olyan jól regisztrálható kockázati tényező, amely befolyásolhatja a HPV fertőzés kimenetelét, a statisztikai elemzésben figyelembe kell venni hatását. A kohorsz mérete az életkor dichotomizálását engedte meg a statisztikai analízisben. A HPV fertőzések perzisztenciáját vizsgáló szakirodalom [61] alapján az elemzésben 35 év alatti életkort hasonlítottuk az ennél idősebbhez. A fiatalabb és az idősebb alcsoportban a közepes/súlyos CIN (CIN2+) előfordulása nagyon hasonló volt (16% és 18%), az egytényezős elemzésben az életkor hatása nem is volt kimutatható. Azonban ahogy a koreloszlásból is látszott, a HPV fertőzöttség lényegesen különbözött a két csoport között. A soktényezős elemzésben (**7. táblázat**) a többi rizikó faktorra standardizálva szerény, de szignifikáns mértékben, mintegy kétszeresre növelte a közepes/súlyos CIN (CIN2+) kockázatát a 35 év feletti életkor.

Az eddig említett és egymással is lehetséges összefüggésben álló kockázati tényezők hatását a CIN kialakulására Cox regressziós analízissel határoztuk meg, amely figyelembe veszi az esetek eltérő követési időtartamát akkor is, ha az definitív szövettani diagnózis miatt zárult le és akkor is, ha olyan egyéb okokból zárult le, mint a kolposzkópos vagy a citológiai regresszió vagy a beteg kontrollvizsgálatainak a megszakadása. A rutin diagnosztikai Hybrid Capture eredmények szerinti analízis (**7. táblázat**) önmagában a jelenség konzisztens természetét erősíti meg, a mi populációnkban is az onkogén HPV fertőzés volt a közepes/súlyos fokú CIN (CIN2+) kialakulásának fő kockázati tényezője. Az onkogén HPV fertőzés egytényezős módon számított, nyers relatív kockázatnál magasabb lett a tisztított relatív kockázati érték, vagyis az az érték, amelynél a többtényezős analízis a többi kockázati tényező zavaró hatását figyelembe vette. Ez a jelenség az onkogén HPV fertőzés és a CIN közvetlen patogenetikai kapcsolatára utal. Fordított helyzet állt elő a citológiai atípiával, amelynél

a többtényezős elemzés csökkentette relatív kockázat számított értékét arra utalva, hogy a citológiai atípi kialakulása részben függ az többi valós kockázati tényezőtől, az onkogén HPV fertőzéstől és a fentebb elemzett életkor hatástól.

7. táblázat Közepes/súlyos cervical intraepithelialis neoplasia (CIN-2+) relatív kockázata (RR, 95% konfidencia intervallum)) virológiai és citológiai státusz szerint.

kockázati tényező	CIN-2+			követés (beteghónap)
	eset/ követett beteg	nyers RR	tisztított RR ^a	
HPV fertőzés:				
nem ^b	3/264	1.0	1.0	7965
*LR ^b	1/23	4.42 (0.46-42.6)	5.6 (0.57-53.6) ^c	567
*HR ^b	71/168	66.9 (20.8-214.8)	76.8 (23.7-249)	2112
simplex *HR	61/131	76.2 (23.6-246)	85.6 (26.2-279)	1602
multiplex *HR	6/19	39.9 (9.9- 161.0)	49.5 (12.2-202)	332
<u>*HR csoportok</u>				
16,18	51/87	102.0 (31.4-331)	119.1 (36.2-391)	950
<u>non16/non18:</u>	15/54	39.6 (14.9-105)	41.6 (15.6-111)	828
31,33,35,51,58	11/43	40.4 (11.1-147)	39.7 (10.9-145)	253
45,52,56	4/11	38.5 (8.6-172.7)	44.4 (9.8-201.0)	575
53, 66, 72 ^d	1/9	14.7 (1.52-142)	21.4 (2.2-209.2)	156
nem tipizálható	4/18	38.7 (8.5-175.6)	58.3 (12.8-266)	178
citológia				
nem kóros	2/147	1.0	1.0	4264
atípiás	73/308	21.0 (5.2-85.5)	16.2 (3.9-66.6)	6380
életkor				
<35	41/267	1.0	1.0	5739
>=35	34/188	1.15 (0.74-1.83)	1.99 (1.26-3.16)	4905

^a A HPV-re vonatkozó RR értékek a citológiai eredményre és az életkorra lettek standardizálva, az életkor és a citológia egymásra ill. a Hybrid Capture Test eredményeire lettek standardizálva.

^b Hybrid Capture Test rendszerben mért eredmény,

^c csak életkorra standardizálva mert citológiai eltérés nagyon ritkán fordul elő a csoportban

^d Hybrid Capture Test-ben keresztreagáló HPV típusok: 53, 66, 72

*LR: alacsony kockázatú, HR: magas onkogén kockázatú HPV

A további kockázati elemzéseket a PCR-RFLP (geno)tipizálás után végeztük. A PCR-RFLP tipizálás 19 betegben multiplex (kettős) HPV fertőzésre derített fényt, akik fiatalabbnak tűntek a simplex onkogén fertőzöttektől (médián kor 24 ill. 31 év, $p=0,056$) és a vírusterhelésre utaló hibridizációs jelerősségben nem szignifikánsan, de elmaradtak (médián: 10,9 RLU/PC ill. 23,2 RLU/PC, $p=0,27$). Ezen különbségek alapján indokoltnak tartottuk, hogy a fertőző típusok multiplicitása alapján is többletanyag elemzést végezzünk. A multiplex fertőzések közepes/súlyos CIN (CIN2+) kialakulására számított kockázati értéke nem szignifikánsan, de elmaradt a simplex fertőzésekétől (RR: 0,58 CI_{95%}: 0,25-1,34), amiből két következtetést vontunk le: a multiplex fertőzéstől nem várható fokozott onkológiai kockázat ill. a fertőző HPV típusok szerinti elemzésben a fertőzés multiplicitását nem vesszük figyelembe.

A teljes genotipizált csoportban a leggyakoribb típus a HPV-16 volt 78 betegben (52%), gyakran előfordult a HPV-33 (21 beteg 14%), HPV-31 (20 beteg 13%) és a HPV-18 (9 beteg 6%). A HPV típusokat [215] olyan összefoglaló alapján csoportosítottuk, amely az invazív *cervix carcinomára* vonatkozó esélyhányadosok metaanalízisén alapult. A szakirodalom és a metanalízis alapján HPV-16 és HPV-18 típusok konzisztensen gyakrabban társulnak invazív *cervix carcinomával*, mint az onkogén típusok többsége. Az elemzés során 16/18 csoportba soroltunk mindenkit, akinek HPV-16 vagy HPV-18 fertőzése volt függetlenül attól, hogy volt-e társfertőzés. A következő csoportot az ismert non-16/18 onkogén HPV fertőzések alkották kivéve, ha 16/18 társfertőzés volt jelen (*l. előző csoport*). Ezt a csoportot a kortárs szakirodalom esélyhányadosai [206, 215] alapján két alcsoportra bontottuk, az egyikbe a HPV-31, -33, -35, -51 és 58, míg a másikba az akkoriban veszélyesebbnek tűnő HPV-45, -52, -56 került. A kohorszunkban azonban nem mutatkozott lényeges kockázat különbség a két alcsoport között, ezért a jelen értekezésben az egyéb onkogén HPV típusokat egységesnek tekintve (non16/non18 HR) végeztük a statisztikai számításokat (**7. és 8. táblázatok**). A következő csoportot a Hybrid Capture HPV Test-ben keresztireagáló és bizonytalan onkogenitású HPV típusok (53, 66, 72) alkották és mintegy ellenőrzésként a genotipizálásra nem alkalmas esetek kockázatát is meghatároztuk (**7. táblázat**). Ugyan az így létrehozott csoportok sem életkorban ($p=0,57$), sem a citológiai atípiá előfordulásában ($p=0,63$) nem különböztek szignifikánsan egymástól, a kockázatbecslésben itt is többletanyag elemzéssel biztosítottuk az életkor és a citológiai atípiá esetleges zavaró hatásának a kiszűrését.

A többletanyag Cox regressziós elemzés valóban különbségeket mutatott ki a különböző típuscsoportok között. A legmagasabb **onkológiai kockázatot** a **HPV-16/18 csoportban** lehetett kimutatni, amely közel **háromszorosan haladta meg** az egyéb onkogén típusokét (**8. táblázat**). Mindazonáltal a magas kockázatú csoport egészére vonatkozó onkológiai kockázat így is több, mint hússzorosan meghaladja meg a csoporton belül észlelt különbséget. A Hybrid Capture HPV Test-ben keresztireagáló és bizonytalan onkogenitású HPV típusok (53, 66, 72) közül a HPV-53 fertőzés mellett alakult ki CIN-2 elváltozás. Az utóbbi fertőzések alacsony esetszáma nagyobb statisztikai szórást eredményezett, de így is szignifikánsan ki lehetett mutatni az onkogén kockázatot.

A vizsgálati kohorszban kihasználtuk a Hybrid Capture HPV Test-nek azt a tulajdonságát, hogy a hibridizációs jel erősség alapján a vírusterhelést lehet becsülni. A 10 ng HPV16 genomra vonatkoztatott RLU/PC értékek 1,0 és 262,5 tartományban voltak (median: 10,5). A vírusterhelés függetlennek látszott a vírusfertőzéssel kapcsolatos olyan paraméterektől, mint a citológiai atípi (p=0,87), életkor 35 év felett (p=0,77) vagy a HPV típusok szerinti csoportosítás (p=0,70). A közepes/súlyos CIN (CIN2+) kialakulására nézve sem bizonyult kockázati tényezőnek (**7. táblázat**). Érdekes azonban megjegyezni, hogy mind a nyolc HPV pozitív CIN-1 lézió mellett alacsony (<10 RLU/PC) vírusterhelést lehetett kimutatni.

8. táblázat Relatív onkogén kockázat (RR, 95% konfidencia intervallum) a magas onkogén kockázatú (high-risk) HPV csoporton belül.

vizsgálódó alcsoport	referencia alcsoport		
	non16/non18 onkogén típusok		
	HPV-53, -66, -72	HPV-31,-33,-35,-51, -58	HPV-45,-52,-56
HPV-16,-18	5.38 (0.74-39.3)	2.98 (1.55-5.74) *	2.74 (0.98-7.64) *
HPV-31,-33,-35,-51, -58	1.38 (0.13-14.4)	1.15 (0.36-3.67)	
HPV-45,-52,-56	1.42 (0.18-11.3)		

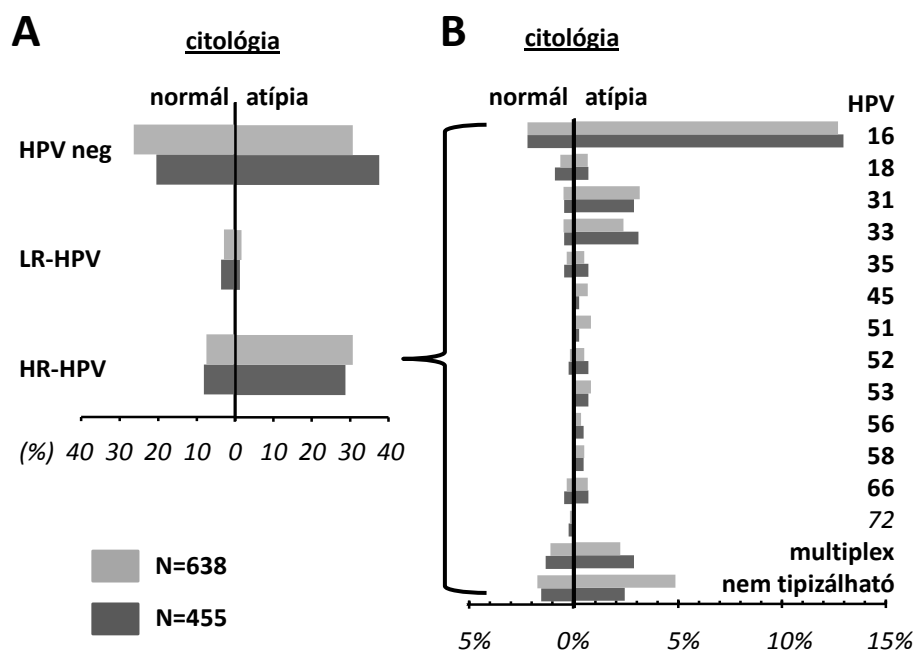
* A két kockázat összevonásából eredő kockázat RR= 2.91 (CI₉₅: 1.67-5.05, melynek páronkénti összehasonlítások számával korrigált p értéke <0.001)

További kockázatelemzéshez a tanulmányunkat kiterjesztettük 638 nőbetegre [213] a következő célokkal: 1. az alaptanulmányban elemzett citológiai atípi csoport heterogenitásának és összetételének becslése, 2. az alaptanulmányban észlelt életkor tényező vizsgálata az életkortól nem független gesztációs anamnézis függvényében, 3. a méhnyakszűrés során kiszűrt betegekben az első észlelés után milyen időtávon, milyen onkológiai kockázatot jelent a kiindulási HPV státusz.

A citológiai atípi és a HPV csoportok, ill. típusok szerinti megoszlás a kiterjesztett tanulmányban nagyon hasonló volt az alaptanulmányhoz (**8. ábra**). Nagyobb eltérés (>5%) a HPV negatív esetek citológiai eredmény szerinti megoszlásában, valamint a PCR RFLP módszerrel nem tipizálható magas kockázatú HPV fertőzések arányában volt (4,9% a 2,4%-kal szemben).

A kockázati tényezők konzisztens megjelenését a kiterjesztett tanulmányban is ellenőriztük (**9. táblázat**). A citológiai atípi, a HPV fertőzés ill. a 35 év feletti életkor hasonló mértékben növelte a premalignus léziók kockázatát, mint az eredeti tanulmányban. A citológiai atípi eredmények Bethesda szempontok szerinti osztályozását 234 esetben sikerült elvégezni. A 49 HSIL citológiai eredmény mögött a követés során 28 esetben derült fény közepes/súlyos *cervical intraepithelialis*

neoplasiás (CIN-2+) elváltozásra, amelynek kockázatát tanulmányunkban a HSIL diagnózis 19-szeresre növelte. Ugyanakkor a LSIL/ASCUS csoportra leszűkített kockázat ($RR=4,19$) is szignifikáns ($p=0,0005$) maradt, ami arra utalt, hogy a korábbi tanulmányunkban alkalmazott citológiai atípiagyűjtőkategória nem egyetlen alcsoport miatt jelentett szignifikáns kockázatot. Mivel a citológiai atípiagyűjtőkategóriára vonatkozó értékek minden betegnél rendelkezésre álltak, a kiterjesztett tanulmányban is ezt a kategóriát vontuk be a többtényezős analízisbe.



8. ábra A kiterjesztett (N=638) és az alaptanulmányban (N=455) a vizsgálati kohorsz megoszlása citológiai atípiá, HPV csoportok (A) és HPV típusok (B) szerint. LR: alacsony kockázatú, HR: magas onkogén kockázatú HPV

A 35 év feletti életkor a kiterjesztett tanulmányban is a citológiára és a HPV státuszra standardizálás után bizonyult kockázati tényezőnek. A kihordott terhességek száma is hasonló kockázati profilt mutatott, szintén a citológiára és a HPV státuszra standardizálás után bizonyult kockázati tényezőnek. A két paraméter nyilvánvalóan nem független egymástól, ezért a citológiai és a virológiai státusz mellett egymásra is korrigálva őket, az életkor elvesztette kockázati tényező szerepét ($RR=0,75$ $CI_{95}=0,39-1,43$), azaz >35 év életkor azért tűnt korábban kockázati tényezőnek, mert a tényleges kockázatot jelentő gesztációs terhelés nagyobb volt a korcsoportban.

A követési időszakban a magas onkogén kockázatú HPV fertőzés mellett a szövettani vizsgálat 109 esetben igazolt CIN-2 vagy súlyosabb rákmegelőző (CIN2+) elváltozást. Az elváltozások többsége (72 lézió) az elváltozást első alkalommal feltáró citológiai vagy kolposzkópos vizsgálatot követő egy éven belül műtéti eltávolításra került, a rákmegelőző (CIN2+) elváltozások verifikációjáig eltelt követési idő 95 percentilis értéke 29 hónap volt. Ezért a követést három időszakra, 1-12 hónap, 13-30 hónap és

>30 hónap szakaszokra osztottuk. Az első szakaszban 576 beteg, másodikban 463 beteg, a harmadikban 264 beteg adatait lehetett felhasználni CIN2+ relatív kockázatának becslésére. Az eredmények egybevágóak azzal, hogy a non-invazív módszerekkel végzett vizsgálatkor az észlelhető elváltozások egy része már előrehaladott állapotban van, de olyan elváltozások is észlelhetők, amelyek kimenetele az első észleléskor még nem ítéltető meg, szoros nyomonkövetés alapján a műtéti eltávolítással meg lehet várni, hogy magától a regresszió vagy a progresszió irányába indul el a folyamat.

A magas kockázatú HPV fertőzéshez társuló onkológiai kockázat következetesen magas volt az 1-12 hónap és 13-30 hónap szakaszokban (**10. táblázat**) és az alaptanulmányhoz hasonlóan >20× mértékben meghaladta, a csoporton belül a HPV-16/18 és az egyéb típusok közötti kockázati különbségeket: A HPV-16/18 típusok onkológiai kockázata az 1-12 hónap szakaszban 3,29-szer (CI₉₅: 1,80-6,0), a 13-30 hónap szakaszban 3,19-szer (CI₉₅: 1,40-7,24) volt magasabb a non-16/18 onkogén típusokhoz képest.

9. táblázat **Közepes/súlyos *cervical intraepithelialis neoplasia* (CIN 2+) relatív kockázata (RR) (95% konfidencia intervallum) virológiai és citológiai státusz szerint.**

	CIN-2+	nyers RR	tisztított RR*	követési idő (hó)
Citológia				
Normál (n=235)	7	1.0	1.0	7559
Citológiai atípiá				
<u>P3 (n=403)</u>	108	11.9 (5.54-25.7)	5.44 (2.52 – 11.77)	8864
<u>újraértékelt:</u>				
LSIL/ASCUS	51	11.2 (5.06 – 24.6)	4.19 (1.88 – 9.34)	4841
n=185				
HSIL n=49	28	67.0 (28.8 – 155.8)	19.0 (8.03 – 45.1)	404
HPV negatív (n=364)	5	1.0	1.0	11909
**LR-HPV (n=30)	1	2.95 (0.35 – 25.3)	4.77 (0.55 – 41.2)	778
**HR-HPV (n=244)	109	63.5 (25.7 – 156.9)	52.0 (20.9 – 129.2)	3736
Életkor (év)				
<35 (n=384)	71	1.0	1.0	9643
≥35 (n=254)	44	0.91 (0.63 – 1.33)	1.56 (1.07 – 2.27)	6780
Kihordott terhesség				
szülésenként		1.07 (0.82 – 1.39)	1.62 (1.17 – 2.24)	

*A többszörös analízisben Hybrid Capture HPV eredményekre, a P3 ill. normál citológiai eredményekre és 35 évnél megosztott életkorra történt a standardizálás.

** LR: alacsony kockázatú, HR: magas onkogén kockázatú HPV

Normál citológia és HPV mentes kiindulási állapot után 121 beteget tudtunk követni legalább 2 évig, amely idő alatt egy betegben sem igazolódott CIN2+ elváltozás. A 121 betegből 94-t legalább 3 évig tudtunk követni, a meghosszabbított követés mellett csak egy esetben igazolódott CIN-2 lézió. Ezen eredmények alapján a **citológiai vizsgálat és a HPV kimutatás együtt 100%** (CI₉₅: 97%-100%) **negatív prediktív értékkel** zárt ki manifeszt rákmegelőző elváltozást 2 év távlatában és 99% (CI₉₅: 94,2%-99,98%) negatív prediktív értékkel 3 év távlatában.

Megbeszélés

A sajátos hazai primer szűrési rendszernek köszönhetően, mind citológiai, mind kolposzkópos elváltozás esetén történt rutin HPV kimutatás. Így olyan esetek is bekerültek a tanulmányba, amelyekben a citológiai eredmény önmagában még gyanú szintjén sem utalt onkológiai jelentőségű folyamatra. A háttérben sokszor időzítési kérdés állt, a kolposzkópos kép alapján gyanítható volt citológiai atípi is, a citológiai mintavétellel együtt a HPV mintavétel is megtörtént, de végül nem minden esetben igazolta a citológiai vizsgálat a gyanút. Az utóbbi eseteket kohorszon belüli kontrollként követtük a citológiai atípi relatív kockázatának becslésére. A várakozásoknak megfelelően a magas onkogén kockázatú HPV fertőzés bizonyult a közepes/súlyos *cervicalis intraepithelialis neoplasia* (CIN-2+) fő kockázati tényezőjének. Ismert, hogy a magas onkogén kockázatú HPV fertőzés mellett kialakuló citológiai atípi érzékeny, egyponos becslést nyújt arra, hogy a háttérben fejlődik-e CIN lézió [216]. A mi tanulmányunkban is a legtöbb közepes/súlyos *cervicalis intraepithelialis neoplasia* (CIN-2+) lézió a magas kockázatú HPV plusz citológiai atípi csoportban alakult ki, de a többi CIN-2+ lézió kialakulására is igaz volt, hogy vagy magas kockázatú HPV fertőzés vagy citológiai atípi jelen volt a követés kezdetén. A citológiai atípi a HPV fertőzésben akkor alakul ki, ha a fertőzés perzisztál [61], azaz az összefüggés elemzés szempontjából a HPV pozitív citológiai atípi a perzisztencia meghatározást helyettesítő, pótlólagos paraméter, amelynek mindaddig független kockázati tényező szerepe várható az elemzésekből, amíg a perzisztenciát közvetlenebbül nem lehet mérni.

A multiplex fertőzések aránya hasonló volt [217] csehországi adataihoz és nem lehetett a simplex fertőzéshez képest többletkockázatot kimutatni hasonlóan az egyik meghatározó populációs tanulmányhoz [218]. A leggyakoribb típusok a HPV-16, -33 és -31 voltak hasonló prevalenciával, mint [219] európai invazív *cervix carcinoma* tanulmányában. A HPV-18 viszont alulreprezentált volt az invazív *cervix carcinoma*-hoz képest más vizsgálatokhoz hasonló mértékben [220-222].

10. táblázat Közepes/súlyos cervical intraepithelialis neoplasia (CIN 2+) relatív kockázata (RR, 95% konfidencia intervallum értékkel) a diagnózisig eltelt idő függvényében

követési időszak (hónap)	kiindulási HPV status (LR, HR) [#]	CIN 2+	nyers RR	tisztított RR*
0 - 12	HPV negatív (n=353)	2	1.0	1.0
	LR HPV (n=28)	0	0	
	HR HPV			
	mind (n=195)	72	87.9 (21.6 – 358.8)	80.4 (19.6 – 330.1)
	HPV16&18 (n=85)	45	138.9 (33.6 – 573.7)	161.4 (38.5 – 677.3)
	egyéb HR típus (n=64)	15	52.5 (12.0 – 229.7)	47.9 (10.9 – 210.5)
	lehetséges HR típus (n=14)	2	28.2 (3.97 – 200.4)	37.3 (5.09 – 272.4)
13 - 30	HPV negatív (n=324)	1	1.0	1.0
	LR HPV (n=24)	1	16.1 (1.007 – 257.8)	22.9 (1.4 – 373.4)
	HR HPV			
	mind (n=115)	32	136.6 (18.6 – 1002.9)	112.8 (15.1 – 840.5)
	HPV16&18 (n=46)	18	214.3 (28.4 – 1615.7)	196.7 (25.4 – 1525.2)
	egyéb HR típus (n=44)	9	88.1 (11.1 – 697.4)	69.7 (8.7 – 557.6)
	lehetséges HR típus (n=9)	0	0	
>30	HPV negatív (n=222)	2	1.0	1.0
	LR HPV (n=11)	0	0	
	HR HPV			
	mind (n=31)	5	22.9 (4.41 – 119.0)	11.0 (2.06 – 58.8)
	HPV16&18 (n=10)	4	57.6 (10.4 – 318.9)	29.2 (5.02 – 170.0)
	egyéb HR típus (n=13)	0	0	
	lehetséges HR típus (n=4)	0	0	
összesen	HPV negatív (n=356)	5	1.0	1.0
	LR HPV (n=29)	1	2.95 (0.35 – 25.3)	4.77 (0.55 – 41.2)
	HR HPV			
	mind (n=232)	109	63.5 (25.7 – 156.9)	52.0 (20.9 – 129.2)
	HPV16&18 (n=107)	67	94.3 (37.5 – 237.0)	81.9 (32.3 – 207.4)
	egyéb HR típus (n=73)	24	40.1 (15.2 – 106.0)	32.6 (12.3 – 86.6)
	lehetséges HR típus (n=14)	2	15.0 (2.89 – 77.8)	14.8(2.8 – 78.3)

*citológiára és életkorra standardizálva

[#]LR: alacsony kockázatú, HR: magas onkogén kockázatú HPV

A kohorsz mérete miatt az magas onkogén kockázatú HPV típusokat nem egyenként, hanem csoportosítva vizsgáltuk. Eredményeink közlésekor [212] kórházi eset-kontroll vizsgálatok esélyhányadosai [206, 215] alapján csoportosítva elemeztük a magas és a lehetséges onkogén HPV típusokat. Saját eredményeink és időközben megjelent populációs alapú tanulmányok [53] alapján az értekezésben a non-16/18 típusok összevont elemzését is elvégeztük. Ez alapján a vakcinába azóta bekerült HPV-16/18 típusok onkogén kockázata mintegy háromszorosa az egyéb magas kockázatú típusokénak.

A Hybrid Capture HPV tesztben keresztregáló magas kockázatú típusok többségét lehetségesen onkogén csoportba sorolták [53, 218]. A saját elemzésünk alapján szignifikáns kockázati tényezői a közepes/súlyos *cervicalis intraepithelialis neoplasia* (CIN-2+) kialakulásának, igaz alacsonyabb az onkogén kockázatot jelentenek, mint az invazív *carcinomához* társuló típusok.

A cervix szűrésben lényeges kérdés, hogy citológiai vagy kolposzkópos elváltozások észlelésekor milyen távon várható a folyamat megítélése. A folyamat szempontjából a cervix szűrés egy pillanatfelvétel, amellyel a léziók kialakulásának különböző állapotait lehet megfogni a nagyon kezdetitől a korai stádiumig (amennyiben a beteg rendszeresen részt vesz a szűrésen). A kiterjesztett tanulmányban ezt a különbséget követési időszakokra bontással közelítettük meg. A tervezésben nagyon hasonló korábbi tanulmányunkat [212] egészítettük ki további kockázati tényezőkkel. A citológiai atípiá esetek nagyobb részét a Bethesda rendszer szerint is lehetett értékelni és mind a HSIL, mind az ASCUS kategória szignifikáns kockázati tényezőnek bizonyult arra, hogy a háttérben CIN2+ fejlődik ki.

Érdekes eredményekhez vezetett az életkor szerepének vizsgálata: egyrészt reprodukáltuk azt a korábbi eredményünket, hogy HPV fertőzésre és citológiai atípiára korrigálás után a 35 év feletti életkor fokozott kockázatot jelent, másrészt a jelenség mögött húzódó alapvető oknak a kiviselt terhességek számát találtuk. Hazánkban a tanulmány kivitelezése óta eltelt időszakban is folytatódott a gyermekvállalás későbbre tolódása, ami arra hívja fel a figyelmet, hogy az életkor tényező kockázati értékei is változhattak azóta, míg a kiviselt terhességek száma továbbra is objektív paraméternek tekinthető.

A cervix szűrés során észlelt hámelváltozásokhoz társuló HPV fertőzés magas onkológiai kockázata az első észlelést követő 30 hónapos időtávon volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy ezen időszak alatt minden olyan elváltozás szoros nyomon követést igényel, amelyben gyógyuláshoz vezető regresszió egyértelműen nem állapítható meg. A kiterjesztett tanulmányban gyűjtött adatok lehetővé tették a HPV asszisztált citológiai szűrés negatív prediktív (NPV) értékének meghatározását. A 3 éves távlatra számított 99% NPV értékünk pontosan megegyezik egy tavaly publikált nagy multicentrikus tanulmányban a 25 év feletti nők méhnyakszűrésének hatékonyságát bemutató adattal [75, 77].

Következtetések

Igazoltuk, hogy a sajátos hazai méhnyakszűrési algoritmus keretei között is a HPV státusz alapján lehet legjobban megbecsülni az onkológiai kockázatot. A citológiai vizsgálat és a HPV kimutató együttesen 100% (CI₉₅: 97%-100%) negatív prediktív értékkel zárt ki manifeszt rákmegelőző elváltozást 2 év távlatában és 99% (CI₉₅: 94,2%-99,98%) negatív prediktív értékkel 3 év távlatában.

Kutatócsoportom írta le, hogy a vakcinába szánt két gyakori típus (HPV-16, HPV-18) onkológiai kockázata háromszorosan meghaladja az egyéb onkogén típusokét. Ez különbség az előfordulási gyakorisággal együtt alátámasztotta e típusok vakcinációs jelentőségét.

Az onkogén HPV csoporton belüli háromszoros különbség több mint hússzor alacsonyabb, mint az a kockázat, amelyet a csoport egésze jelent. A méhnyakszűrés hatékonyságát jelentős mértékben növeli az onkogén HPV csoport szintjén informatív diagnosztika, amelyhez képest a csoporton belüli további tipizálás szekunder prevenció értéke elhanyagolható.

A gazdaszervezeti tényezők közül a kiviselt terhességek kockázati tényező szerepét igazoltuk

Humán papillomavírus (HPV) kimutatás prognosztikai jelentősége méhnyaki léziók sebészi eltávolítása után

(Hernádi et al 2005 [223])

A CIN léziók sebészi eltávolítása után a rekurrens betegséget rendszeres ellenőrző vizsgálatokkal lehet időben észlelni. Az eltávolított léziók szövettani vizsgálatának egyik kérdése, hogy ép széllel sikerült-e az eltávolítás, azaz a lézió teljes egészében eltávolításra került-e. Ha igen, akkor végleges gyógyulás várható [224, 225]. Ha nem, akkor továbbra is fennáll a rekurrens betegség kockázata, azaz a nem ép széllel eltávolított léziós esetek egy részében kiújul a folyamat. Az utóbbit rendszeres citológiai és kolposzkópos ellenőrzéssel lehet kontrollálni [224, 226]. Ez a longitudinális kontroll éppen az időbeni elhúzódás miatt jelent pszichés terhelést a beteg számára. Ugyanakkor egyes sajátosságai miatt maga a HPV fertőzés is alkalmas lehet a betegség, akár a minimális reziduális betegség érzékeny kimutatására ugyanis a fertőzött gócban a HPV onkogének folyamatos expressziója szükséges a neoplázia fenntartásához és progressziójához, miközben a környező egészséges hámsejtek mentesek a HPV fertőzéstől [227]. A CIN lézió sebészi eltávolítása után megfigyelhető tendencia a HPV eltűnése [228, 229].

Kutatási cél:

A HPV státusz prognosztikai értékének vizsgálata CIN léziók műtéti eltávolítása után [223].

Betegcsoport. A HPV típusokat vizsgáló tanulmányunk [212] elemzése közben 76 olyan nőt is azonosítottunk, akinek a vizsgált időszakban (1997 május – 1999 december) úgy kértek rutin HPV vizsgálatot, hogy anamnézisükben szerepelt korábbi cervikális lézió eltávolítás. Az eltávolított léziókban a szövettani vizsgálat 61 esetben mutatott ki CIN elváltozást a következő megoszlásban: 12 CIN-1, 18 CIN-2 és 31 CIN-3/CIS. A műtét utáni nyomon követés (20-53 hónap, medián 33 hónap) kezdő időpontjának értelemszerűen a műtét időpontját tekintettük. A nyomon követés során rendszeresen történt rutin citológiai vizsgálat (median intervallum: 5 hónap) valamint HPV kimutatást is kértek.

Értékelés. A tanulmányban két kimeneteli pontot vizsgáltunk, a perzisztáló citológiai atípiát és a szövettanilag igazolt CIN elváltozást, amelyekre vonatkozóan meghatároztuk a műtét utáni HPV státusz prediktív értékeit a 95 % megbízhatósági tartománnyal együtt.

Eredmények:

A 61 beteg CIN eltávolítás utáni nyomon követése során 18 betegben lehetett HPV-t kimutatni Hybrid Capture módszerrel. A magas kockázatú HPV pozitív eredményeket minden esetben megerősítettük és egyben tipizáltuk PCR-RFLP módszerrel. A követés során HPV negatív 43 betegből 32 esetben volt

lehetőségünk PCR módszerrel utólag ellenőrizni a Hybrid Capture eredményeket, mind a 32 esetben a negatív PCR eredmény is a HPV fertőzés ellen szólt, azaz megerősítette a Hybrid Capture módszer specificitását. Amennyiben a CIN eltávolítás után HPV fertőzés nem volt kimutatható, akkor a rekurrens betegséget nagy biztonsággal ki lehetett zárni (**11. táblázat**), sem perzisztáló citológiai atípiát, sem CIN lézió nem alakult ki a 43 HPV negatív beteg egyikében sem (26 hónap medián követési idő alatt). A számított negatív prediktív érték minden kimenetel vonatkozásában 100% volt, amelynek megbízhatósági tartománya még ebben kohorsz méretben is teljes egészében 90% felé esett.

11. táblázat A HPV státusz szerepe a rekurrens betegség prognózisában

Hybrid Capture eredmény	N	kimenetel	prediktív értékek [CI _{95%}]
<i>perzisztáló citológiai atypia</i>			
HPV pozitív	18	10	PPV: 56% [30.8-78.5]
HPV negatív	43	0	NPV: 100% [91.8-100]
<i>CIN</i>			
HPV pozitív	18	5	PPV: 28% [9.7-53.5]
HPV negatív	43	0	NPV: 100% [91.8-100]
<i>CIN-2, CIN-3/CIS</i>			
HPV pozitív	18	4	PPV: 22% [6.4-47.6]
HPV negatív	43	0	NPV: 100% [91.8-100]

NPV: negatív prediktív érték, PPV: pozitív prediktív érték, CI_{95%}: fiducia intervallum

A kohorszban négy olyan beteg volt, akiknél a szövettani vizsgálat szerint nem sikerült ép széllel eltávolítani az primer CIN léziót. Az egyik ilyen primer lézió CIN-3 súlyosságú volt, de az *in toto* eltávolítás nem teljesülése mellett sem lehetett a műtét utáni nyomon követés (29 hónap) során sem citológiai atípiát, sem HPV fertőzést kimutatni, annak ellenére sem, hogy a HPV vizsgálatot összesen négy alkalommal kértek ebben az esetben. Másik oldalról közelítve a kérdést, megállapítható, hogy rekurrens betegség csak a műtét után észlelt HPV pozitivitás mellett alakult ki. A műtét utáni HPV pozitív esetek 56%-ában (10/18) perzisztáló citológiai atípiát alakult ki, 22%-ában (4/18) kiújult a premalignus folyamat. Nyolc olyan beteget azonosítottunk, akiknél a műtét utáni HPV fertőzést más típus okozta, mint a műtét előtti. Közülük csak egy betegben alakult ki perzisztáló citológiai atípiát utalva arra, hogy műtét után új HPV fertőzés is kialakulhat hosszú távon újabb kockázatot jelentve. A 10 betegből, akinél a műtét után észlelt HPV fertőzés mellett perzisztáló citológiai atípiát alakult ki, hétben HPV-16 fertőzés volt jelen és mind a négy rekurrens súlyos fokú CIN lézióban (**11. táblázat**) ez a típus volt jelen.

Megbeszélés

A tanulmányunkban három klinikai típusú kimenetel, a perzisztáló citológiai atípiát, összes CIN ill. súlyos fokú CIN lézió kialakulását vizsgáltuk a műtéti eltávolítás utáni HPV fertőzés függvényében. A műtétet követően a HPV pozitivitásnak két forrása lehet, új fertőzés ill. a premalignus elváltozás reziduumból rekuráló megbetegedés. Vizsgálatunkban új fertőzésre utalt, ha a műtét után a műtét előttihez képest másik HPV típus jelent meg. Az új fertőzések lefolyása tranziens jellegű volt és alig járt citológiai atípiával együtt. A műtét utáni HPV negativitás magas *negatív prediktív értéke* jó összhangban volt más vizsgálatokkal [230, 231]. A HPV vizsgálatot valamelyik citológiai kontrollhoz célszerű időzíteni. Nobbenhuis és mtsai [232] szerint a műtéti eltávolítást követő 6. és 24. hónapban végzett HPV kimutatás citológiai vizsgálattal együtt elégséges ahhoz, hogy mindkét szűrés konzisztens negativitása esetén a beteg további szűrése a normál primer szűrési protokoll szerint folytatódjon. A mi eredményeink hasonló követési idő mellett azt mutatták, hogy 6 havonkénti citológiai ellenőrzés és lehetőség szerint az első évben végzett HPV kimutatás is hatékonyan kizárja CIN lézió kifejlődését.

Következtetés

A CIN léziók műtéti eltávolítása után a negatív HPV eredmény jó prognózist jelent. Ha a műtét után is van kimutatható HPV fertőzés, akkor segít a fertőző típusok pontos meghatározása és összevetése az eltávolított lézió HPV típusával. A típusváltás is reziduális folyamat ellen szól, míg a műtét előtt és után azonos HPV típus rekurrens CIN kockázatát jelzi.

A cervikális karcinogenezist befolyásoló védekező mechanizmusok vizsgálata

Szervezeti szinten a HPV elleni védekezés a cervikális karcinogenezis egyik alapvető tényezője [233]. A papillomavirális karcinogenezisben olyan egyéb tényezők szerepét is vizsgálták, mint a dohányzás, a hormonális fogamzásgátlás [234], vagy a társfertőzések [235, 236], de csak marginális és dózisfüggő hatást sikerült kimutatni. A HPV ellenes szervezeti védekezést közvetlenül alig lehet vizsgálni, mert magának a fertőzésnek az egyéni megítélése is meglehetősen bizonytalan. Ugyan közepes vagy magas virális kópiaszám kimutatása egyértelmű jele a fennálló fertőzésnek, a fertőzés kimenetele, mennyiségi csökkenése, eradikálódása csak igen nagy bizonytalansággal ítéltető meg az egyén szintjén. Ezért lett kézenfekvő az a tudományos megközelítés, hogy populációs szinten epidemiológiai módszerekkel vizsgálják a nem eradikálódott fertőzések következtében kialakuló elváltozásokat a méhnyakon. Más megfogalmazásban a cervikális karcinogenezisre plauzibilisen ható tényezők kockázati szerepét az elsődleges etiológiai tényező HPV vírussal együtt vizsgálták jól definiálható klinikai elváltozásokra vonatkoztatva. Viszonylag szórványosan foglalkoztak HLA-I molekulák kockázati tényező szerepével és felvetették a HLA-A2 [237] és HLA-B44 [238] fokozott halmozódását a HPV által indukált méhnyaki megbetegedésekben. Egyes HPV-16 variánsok a HLA-A2 és -B7 antigénprezentációt kerülhetik el [239, 240]. Lényegesen többet vizsgálták a HLA-II antigének szerepét a cervikális karcinogenezisben.

HLA-II allélek kockázati szerepe a cervikális karcinogenezisben

(Kónya et al 2001 [233])

Az egyedi tanulmányok publikus szakirodalmi adatainak tárgyilagos feldolgozását a következő tényezők indokolták:

- Az egyedi tanulmányok nem vagy alig tudták biztosítani azt a szükséges méretet, amelyet a számos HLA-II allél igényelt volna
- A különböző tanulmányok direkt összehasonlítását nehezítette az elsődleges etiológiai faktor HPV különböző előfordulási aránya
- A két polimorf polipeptidből felépülő HLA DQ molekulák esetében az egyedi allélra vizsgált kockázat különböző lehet olyan populációkban, amelyekben a másik polipeptidet kódoló allélok előfordulása lényegesen eltérő.
- A HLA régió genetikai kapcsoltsága miatt a tényleges kockázati szereppel bíró génekkel szorosan kapcsolt gének látszólagos kockázati szerepét lehet észlelni.

Adatok, források. A PubMed adatbázisból „HLA” és „papillomavirus” vagy „HLA” és „cervical cancer/neoplasia” kombinációkat kerestünk közlemények címében és absztraktjában. Az azonosított

közleményeket idéző közleményeket a „Science Citation Index” adatbázisból néztük át. Azokat a HLA haplotípusokat vizsgáltuk, amelyeket legalább egy közleményben szignifikáns kockázati tényezőként azonosítottak. A cervikális folyamatokra specifikus HLA halmozódást egységesen az esélyhányados (OR, odds ratio) értékek alapján értékeltük. Amennyiben az adott közlemény nem adta meg az esély hányados értéket, akkor az esélyhányados értékét és megbízhatósági tartományát az allélfrekvencia értékekből logisztikus regressziós módszerrel számítottuk. A módszerrel a *béta* logisztikus regressziós koefficiens és annak varianciája számítható. A *béta* koefficiens az esélyhányados természetes alapú logaritmus. A metanalízis során a különböző tanulmányok *béta* értékeiből súlyozott átlagot számoltunk, a súlyozás a variancia reciprokával történt. Az így kapott *súlyozott béta* (β_s) értékre emelve az *e* természetes alapot számoltuk ki az összesített esélyhányadost. A tanulmányok *béta* értékeihez tartozó varianciák hasonló súlyozásával számoltuk ki a súlyozott *béta* érték varianciáját (V_s). A $(\beta_s) - 1,96 \times (V_s)^{1/2}$ ill. a $(\beta_s) + 1,96 \times (V_s)^{1/2}$ összegekre emelve az *e* természetes alapot megkaptuk az összesített esélyhányados 95%-os megbízhatósági tartományának (konfidencia intervallum) szélső értékeit.

A források bevonásánál figyelembe vettük az epidemiológiai tervezést is. A betegségre specifikus HLA halmozódás legmegbízhatóbban populációs alapú vagy követéses vizsgálatból ítélték meg. Ezek mellett bevontuk olyan adatokat is, amelyek kórházi epidemiológiai tanulmányból származtak vagy helyi véradók adatai szolgáltattak egészséges kontrolcsoportként. Nem kerültek bevonásra azon tanulmányok, amelyek a kontroll populációt nem definiálták vagy kontrollok más populációból származtak, mint a minták. Az értékelésben a statisztikai erő lényeges csökkenése nélkül be lehetett építeni az elsődleges etiológiai tényező humán papillomavírust. Ennek megfelelően fertőzés kimenetelét HPV indukált cervikális betegség, HPV-16 pozitív és non-16 HPV-pozitív cervikális betegség kategóriákban vizsgáltuk (**12. táblázat, 13. táblázat**). Az utóbbi két kategória összehasonlításával a HPV típus szerinti különbségeket tudtuk értékelni. Mivel ez utóbbi összehasonlító értékelést a kontroll populáció kiválasztási kritériumai nem befolyásolták, ezért itt azokat a tanulmányokat is figyelembe vettük, amelyeket a többi elemzésbe a nem megfelelő kontrollok miatt nem vontunk be.

Elemzés

Az összesített esélyhányados értékek két HLA-DR antigén szignifikáns halmozódását mutatták HPV által indukált premalignus és malignus méhnyaki elváltozásokban, míg a HLA DR13 protektívnek bizonyult (**12. táblázat**) a fertőző HPV típustól függetlenül. A Janus arcú HLA-DR7 antigén HPV-16 fertőzésekben kockázati tényezőnek, míg non-16 HPV fertőzésekben protektívnek bizonyult. Ennél az antigénnel nyilvánult meg leginkább a HPV-16 pozitív és non-16 HPV-pozitív esetek összehasonlításának hasznossága: Míg az epidemiológiai tervezés miatt az egészséges kontrollokhoz viszonyított halmozódást csak öt tanulmányból [241-245] lehetett összesíteni, addig a HPV típusokon

belüli összehasonlításra további négygel [246-249] kiegészítve összesen kilenc tanulmány volt alkalmas. Az egyes tanulmányok konzisztens voltát jelezte, hogy a kilenc tanulmányból összesített összehasonlítás esélyhányadosa teljesen összhangban volt egészséges kontrollok szerint is értékelhető öt tanulmány esélyhányadosaival. Az másik kockázatos HLA-DR antigén a HLA-DR15 volt, de csak a HPV-16 fertőzésekben nyilvánult meg kockázati szerepe. Ahol rendelkezésre állt, ott a HLA-DRB1*1501 allél (HLA-DR15 gyakori allélja) hatását külön is összesítettük. Az összesítésbe bevontuk a HLA-DRB1*1501 alléllal nagyon szoros genetikai kapcsoltságban álló HLA-DQB1*0602 allélra vonatkozó frekvencia adatokat (*olyan tanulmányokból, amelyek csak a DQ allélok szerepét vizsgálták* [237, 250-252]). Így valójában egy DR-DQ haplotípusra szűkítettük az elemzést, de ennek eredményei is konzisztensek voltak a HLA-DR15 szerospecifitásra vonatkozó eredményekkel. A szoros genetikai kapcsoltság miatt más kombinációban olyan ritkán fordult elő mind HLA-DRB1*1501, mind a HLA-DQB1*0602 allél, hogy nem lehetett megállapítani, melyik felelhet a betegség-specifikus halmozódásért (**12. táblázat**).

12. táblázat HLA-DR antigének relatív halmozódása [összesített esélyhányados (95% konfidencia tartománnyal)] HPV által indukált premalignus és malignus méhnyaki megbetegedésben

HLA-II	betegekben a kontrollokhoz viszonyítva	HPV-16 poz. betegekben a kontrollokhoz viszonyítva	egyéb HPV típusra poz. betegekben a kontrollokhoz viszonyítva	HPV-16 poz. betegekben egyéb HPV típusra poz. betegekhez viszonyítva
DR7	1,01 (0,80-1,27) f: [241-245, 253-256]	1,42 (1,12-1,80) f: [241-245]	0,61 (0,41-0,92) f: [241-245]	2,63 (1,67-4,16) f: [241-249]
DR13	0,69 (0,56-0,85) f: [241-245, 253-256]	0,51 (0,38-0,68) f: [241-245]	0,53 (0,38-0,75) f: [241-245]	1,06 (0,68-1,64) f: [241-249]
DR15	1,29 (1,13-1,47) f: [241-245, 253-257]	1,47 (1,20-1,81) f: [241-245, 257]	0,94 (0,74-1,19) f: [241-245, 257]	1,34 (1,01-1,78) f: [241-249, 257]
DRB1*1501 [#]	1,15 (0,98-1,34) f: [241-243, 245, 250-252, 254, 255, 257]	1,36 (1,10-1,69) f: [241-243, 245, 250-252, 257]	1,02 (0,79-1,31) f: [241-243, 245, 250-252, 257]	1,28 (0,96-1,71) f: [241-252, 257, 258]

f: a feldolgozott adatok irodalmi forrása, [#] Az elemzésbe olyan adatokat is bevontunk, amelyek a DRB1+1501 szoros genetikai kapcsoltságban álló DQB1*0602 allél vizsgálatából származtak [237, 250-252].

A DQ lokuszon a HLA-DQ3 kockázati szerepét már 1991-ben felvette Wank és Thomssen [256]. A csoportba tartozó allélok és kódolt proteinjük azonban számos keresztreakciót mutat ellenanyag epitópokban, ezért a metanalízist az allélokra vonatkozóan végeztük, amelyek közül konzisztensen a

DQB1 allélok adatait adták meg az egyes tanulmányok. A DQB1*0301 alléllal kapcsolatban nem lehetett a HPV pozitív betegségre specifikus halmozódást kimutatni (**13. táblázat**). Ennek egyik oka lehetett az, hogy a vizsgált populációkban a DQB1*0301 két gyakori haplotípusban is előfordul a DQA1*0301/02 ill. a DQA1*0501 alléllal kapcsolatosan. A két haplotípus valószínűleg eltérő antigén prezentáló tulajdonsággal rendelkezik, ami a DQB1*0301 alapján meghatározott csoport heterogenitását is jelenti.

A DQB1*0302 hordozás jóval egységesebb DQ haplotípust határoz meg, mivel szoros genetikai kapcsoltságban a DQA1*0301/02 allélokkal szokott előfordulni. A DQB1*0302 szignifikáns kockázati tényezőnek bizonyult a HPV-16 pozitív méhnyaki elváltozásokban. A DQB1*0303 szintén csak egy DQA1 alléllal (DQA1*0201) van gyakori kapcsoltságban és szintén kockázati tényezőnek bizonyult a HPV-16 pozitív méhnyaki elváltozásokban (**13. táblázat**).

13. táblázat HLA-DQ gének relatív halmozódása [összesített esélyhányados (95% konfidencia tartománnyal)] HPV által indukált premalignus és malignus méhnyaki megbetegedésben

<i>HLA-II</i>	<i>betegekben a kontrollokhoz viszonyítva</i>	<i>HPV-16 poz. betegekben a kontrollokhoz viszonyítva</i>	<i>egyéb HPV típusra poz. betegekben a kontrollokhoz viszonyítva</i>	<i>HPV-16 poz. betegekben egyéb HPV típusra poz. betegekhez viszonyítva</i>
DQB1*03xx	1,25 (1,15-1,37) <i>f</i> : [237, 241-243, 245, 250-260]	1,21 (1,02-1,43) <i>f</i> : [241-243, 245, 250- 252, 257]	1,17 (1,02-1,37) <i>f</i> : [241-243, 245, 250-252, 257]	1,04 (0,87-1,25) <i>f</i> : [241-243, 245, 246, 248- 252, 257]
DQB1*0301	1,22 (1,07-1,39) <i>f</i> : [237, 241-243, 245, 250-254, 257]	1,08 (0,89-1,30) <i>f</i> : [241-243, 245, 250- 252, 257]	1,14 (0,84-1,54) <i>f</i> : [241-243, 245, 250-252, 257]	0,9 (0,66-1,25) <i>f</i> : [241-243, 245, 246, 249- 252, 257]
DQB1*0302	1,25 (1,07-1,45) <i>f</i> : [237, 241-243, 245, 250-254, 257]	1,34 (1,06-1,69) <i>f</i> : [241-243, 245, 250- 252, 257]	0,92 (0,69-1,24) <i>f</i> : [241-243, 245, 250-252, 257]	1,38 (1,00-1,90) <i>f</i> : [241-243, 245, 246, 249- 252, 257]
DQB1*0303	1,34 (1,02-1,77) <i>f</i> : [237, 241-243, 245, 250-254, 257]	1,6 (1,03-2,47) <i>f</i> : [241-243, 245, 250- 252, 257]	1,21 (0,73-1,98) <i>f</i> : [241-243, 245, 250-252, 257]	1,3 (0,71-2,40) <i>f</i> : [241-243, 245, 246, 249- 252, 257]

f: a feldolgozott adatok irodalmi forrása

Megbeszélés

A HLA-II rendszer alapvető szerepe az antigénprezentálás a CD4+ T-sejtek számára, amelyek fő feladata további immuneffektor mechanizmusok stimulálása. Megfigyelések alapján celluláris immunitás szuppressziója fokozza a HPV indukált anogenitális léziók gyakoriságát [62, 64, 65]. A HLA rendszerben rejlő diverzitás populációs szinten adaptációs mechanizmus a fertőző mikroorganizmusokhoz, magas diverzitású populációban mindig akadnak olyan egyének, akik szervezete egy váratlan mikroorganizmussal szemben a hatékonyabban veszik fel harcot, mint a populáció többi tagja. Ami az egyik helyzetben az átlagosnál előnyösebb, az a másik helyzetben akár hátrányosabb is lehet. Az adott fertőzéssel szemben hátrányos genetikai variáció akkor szelektálódhat ki a populációból, ha a reprodukív kor előtt vagy a reprodukcióra hat hátrányosan a fertőzés. A HPV betegségek jellegzetesen a reprodukció után manifesztálódnak, azaz nem volt meglepő, hogy több HLA specificitás is fokozott kockázatot jelent a HPV betegségekre.

Következtetés.

A papillomavírus fertőzések következtében kialakuló premalignus és malignus méhnyaki megbetegedések kockázatát befolyásolja az egyén HLA összetétele. HPV indukált cervikális betegség, HPV-16 pozitív és non-16 HPV-pozitív cervikális betegség kategóriákban összesítettük az egyes HLA típusok betegség-specifikus halmozódását. Az összesített esélyhányados és konfidencia intervallum értékek alapján HPV indukált cervikális betegséggel szemben protektívnek bizonyult a DR13 HLA specificitás, HPV-16 pozitív cervikális betegségre emelkedett kockázatot jelentett a DR7 HLA specificitás, a DRB1*1501–DQB1*0602 haplotípus, valamint a DQB1*0302 és DQB1*0303 allélok. Non-16 HPV-pozitív cervikális betegséggel szemben protektívnek bizonyult a DR7 HLA specificitás.

Interleukin (IL)-10 nt-1082(rs1800896) nukleotid polimorfizmusának (A/G) kofaktor szerepe a cervikális karcinogenezisben

(Szőke et al 2004 [261])

A méhnyak transzformációs zónájában más szövetekhez képest fiziológiásan magasabb TGF-beta1 és IL-10 expresszió, ami az egyik magyarázat lehet arra, hogy ép szisztémás immunitás mellett miért sokkal magasabb a HPV indukált *carcinomák* kialakulásának esélye ezen a területen, mint bármely más mukozális hámon [66]. Ugyan az IL-10 termelés az ovulációs ciklustól függetlenül állandó [67], mind gazdaszervezeti tényezők, mind fertőzések jelentős egyéni variációkhoz vezethetnek a citokin szintekben [68, 69]. A premalignus elváltozásnak számító közepes vagy súlyos fokú CIN léziókban az IL-10 expresszió tovább emelkedik és együtt jár az IFN-gamma expresszió csökkenésével [66, 70]. Ezen betegekben a szisztémás citokin profil is Th2/Treg irányba tolódik el [65, 262]. Lokálisan az IL-10 elsősorban az antigénprezentációt gátolja [71], bár azt is meg kell említeni, hogy CD8+ citotoxikus T-limfociták aktiválódása és immigrációja után az emelkedett lokális IL-10 szint a citotoxikus aktivitást fenntartja és erősíti [263, 264].

Eset-kontroll tanulmányban vizsgáltunk az IL-10 promoterben nt-1082 polimorf nukleotid pozíció szerepét. Az IL-10 promoter mintegy 4 kb területet foglal el [265], melyben számos polimorf nukleotid pozíciót leírtak. A transzkripció kezdettől -1082 pozícióban található polimorfizmus az egyik transzkripciósfaktornak az Ets-nek a kötődését és a promoter aktivitást befolyásolja [266, 267]. A magasabb IL-10 expressziós aktivitást biztosító nt-1082 G allél fokozott halmozódást írtak le cervix *carcinomában* [268] olyan populációban, amelyben az A allél gyakorisága lényegesen meghaladja a G allélét. A Kaukázusi populációban ezzel szemben a G allél majdnem olyan gyakori, mint az A.

Kutatási cél

Cervikális hámléziók háttérében álló IL-10 nt-1082 (A/G) nukleotid polimorfizmus vizsgálata olyan populációban, amelyben mindkét allél előfordulása gyakori.

Betegcsoport A vizsgálati csoportot 125 onkogén HPV pozitív és 128 HPV negatív beteg alkotta, akiknél a citológiai vagy a kolposzkópos vizsgálat atípiát tárt fel és nt-1082 allél-specifikus PCR módszerrel egyedi nukleotid polimorfizmust tudtunk vizsgálni az IL-10 promoterben. A HPV pozitív esetek életkora az elváltozás első észlelésekor 18 és 56 éves tartományban mozgott (medián 31 év), a citológiai vizsgálat 78 %-ban tárt fel atípiát, a maradék 22%-ban citológiai eltérés nem igazolódott. A HPV fertőzött csoportban az onkogén HPV pontos típusát 96%-ban lehetett azonosítani. A HPV típusok eloszlása megfelelt a korábbi tanulmányainknak [212, 213], a gyakori típusok a HPV-16 (50,4%), a HPV-33 (12,6%), a HPV-31 (10%) és a HPV-18 (6%) voltak. Mellettük kis arányban a

következő HPV típusokat mutattuk ki: 35, 45, 52, 53, 56, 58, 66, 72 és 82. A HPV negatív csoport életkora 19-61 éves tartományt ölelt fel (medián 35 év) és 65 %-ban volt jelen citológiai atípiá.

14. táblázat IL-10 promoter nt -1082 genotípusok megoszlása cervikális hámlézióban szenvedő betegekben (keresztmetszeti tanulmány)

kontrollok		HPV negatív lézió		HPV pozitív lézió	
n=168		NOS ¹ n=45	P3 ² n=83	NOS ¹ n=28	P3 ² n=97
genotípus					
AA	42 (25%)	18 (40%)	35 (42%)	8 (29%)	27 (28%)
AG	86 (51%)	19 (42%)	39 (47%)	13 (46%)	52 (54%)
GG	40 (24%)	8 (18%)	9 (11%)	7 (25%)	18 (18%)
allél	A: 0,51	A: 0,63	A: 0,66	A: 0,52	A: 0,55
frekvencia	G: 0,49	G: 0,37	G: 0,34	G: 0,48	G: 0,45
		³ p=0,13	³ p=0,006	³ p=0,89	³ p=0,60

¹ nem onkológiai jelentőségű citológiai eredmény

² citológiai atípiá (Papanicolaou osztályozás alapján)

³ chi² statisztika a genotípus megoszlásra a kontrollokhoz viszonyítva

Eredmények

Az egészséges kontroll csoportban az IL-10 promoter nt-1082 pozíciójában az A allél frekvencia 0,51, a G allél frekvencia 0,49 volt és a genotípusok eloszlása is megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak (**14. táblázat**). Ehhez képest szignifikánsan (p=0,05) eltérő volt a megoszlás a betegcsoport egészében (n=253), a genotípus AA volt 88 esetben (35%), AG volt 123 esetben (49%) és GG volt 42 esetben (16%). A betegcsoportot az onkogén HPV fertőzésre (n=125) leszűkítve [AA (28%), AG (52%), GG (20%)] nem lehetett kimutatni a szignifikáns változást (p=0,70) az egészséges kontrollhoz képest, akkor sem, ha a HPV pozitív eseteket citológiai eredmény szerint tovább bontottuk (**14. táblázat**), valamint akkor sem, ha az elemzést a leggyakoribb HPV-16 típusra szűkítettük le (p=0.61).

15. táblázat IL-10 promoter nt -1082 genotípusok kockázati szerepe HPV negatív cervikális hámléziókban (cross-sectional study)

	kontroll	<u>HPV negatív NOS¹ lézió</u>		<u>HPV negatív P3² lézió</u>	
genotípus	(n)	(n)	OR* (95% CI)	(n)	OR* (95% CI)
AA	42	18	1.0	35	1.0
AG	86	19	0.56 (0.26-1.23)	39	0.56 (0.31-1.02)
GG	40	8	0.50 (0.19-1.30)	9	0.27 (0.11-0.63)
			³ p=0.13		³ p=0.05

*OR: esélyhányados 35 év alatti és feletti korcsoportokra standardizálva (95% confidence intervallum),

¹ nem onkológiai jelentőségű citológiai eredmény

² citológiai atípiia (Papanicolaou osztályozás alapján)

³ p for trend statisztika

A betegcsoport alábontása viszont a HPV negatív cervikális elváltozások csoportjában tárt fel allél frekvencia eltérést és a genotípus arányok megváltozását. Az utóbbi a HPV-negatív atípiia csoportban szignifikánsnak ($p=0,006$) bizonyult (**14. táblázat**), az A allélt hordozó genotípusok kerültek túlsúlyba. A két allél közötti relatív kockázati különbséget logisztikus regressziós modellben számított esélyhányadossal fejeztük ki. Mivel az A allél jóval gyakoribb a legtöbb non-kaukázusi populációban, az AA homozigóta genotípust tekintettük referenciának és az AG ill. a GG relatív kockázatát számítottuk ki. A GG genotípus kb. 4x kisebb szignifikáns kockázatot, azaz szignifikáns rezisztenciát jelentett a HPV negatív citológiai atípiával szemben a referencia AA genotípushoz képest (**15. táblázat**). Az AG genotípusnál észlelt kockázatcsökkenés ($OR=0,56$) konfidencia intervalluma (CI_{95} : 0,31-1,02) megközelített, de nem ért el szignifikáns szintet. Ugyanakkor a logisztikus regressziós modellben számított $p_{for_trend}=0,05$ érték felvetette azt a lehetőséget, hogy G allél dóziszfüggő módon csökkent a kockázatot. A többtényezős logisztikus regressziós elemzésben korrigáltunk az összehasonlított csoportok közötti eltérő életkor eloszlásra, ill. azt is megmutattuk, hogy életkor (<35 vs. ≥ 35) nem befolyásolta szignifikánsan sem a GG ($OR=1,18$; CI_{95} : 0,71-1,97), sem az AG ($OR=0,78$; CI_{95} : 0,41-1,50) genotípusok hatását a HPV negatív citológiai atípiára.

Megbeszélés

Az IL-10 promoter nt-1082 polimorfizmus hatását az IL-10 szekrécióra többen is vizsgálták és azt találták, hogy különböző eredetű sejtvonalakban transzkripciós szinten befolyásolja az IL-10 termelést [266, 267]. Nt-1082 G allél hordozó donorok mononukleáris sejtek poliklonális stimulálása Concanavalin A kezeléssel fokozott IL-10 szekréciót eredményezett az AA homozigótákhoz képest [269]. Az utóbbi megfigyelés azért emelendő ki, mert a cervikális nyálkahártyát infiltráló sejtek többsége T-limfocita [233], amelyek jól stimulálhatók Concanavalin A kezeléssel. Az IL-10 szekréció is megfigyelhető Concanavalin A kezelésben, amelyben valószínűleg T_{reg} típusú kompenzációs mechanizmusként működik [270] az nt-1082 polimorfizmustól függő módon. A fokozott IL-10 szekretáló képesség a gyulladás korlátozásával védhet a gyulladásos környezetben könnyen kialakuló diszpláziáktól, atípiáktól.

A hazai populációban nem igazolódott egyik IL-10 promoter nt-1082 allél halmozódása sem a HPV indukált hámléziókban. Hozzánk hasonlóan nem talált ilyen összefüggést a témában öt évvel később végzett nagy átfogó polimorfizmus projekt sem [271]. Ugyanezen alléloknak az invazív *cervix carcinomára* jellegzetes megoszlását viszont több tanulmány is felvetette [268, 272].

Érdekes eredménynek tartjuk azonban a HPV fertőzéstől független hámelváltozásokban tett megfigyeléseinket. Az utóbbi elváltozásokban valószínűleg jóval gyakoribb a gyulladásnak a szerepe, amit viszont közvetlen függésben van az anti-inflammatorikus citokinnel ill. annak expressziós szabályzásával.

Következtetés

Az IL-10 promoterben nt-1082 G allélt hordozó nők kevésbé voltak fogékonyak a HPV fertőzéstől független citológiai atípiára, mint az AA homozigóták. Ugyanakkor a HPV által indukált citológiai eltérésekre nem hatott az IL-10 promoter nt-1082 polimorfizmus.

Epigenetikai szabályzó mechanizmusok vizsgálata a cervikális karcinogenezisben

Az IL-10 gén expressziós inaktivitása és a promoter CpG metilációja epiteliális eredetű normál és tumor eredetű sejtekben

(Szalmás et al 2008 [273])

A transzformációs zóna konstitutív IL-10 környezete felvetette a forrás kérdését, elsősorban azt, hogy a humán papillomavírusok célsejtjei, a laphámsejtek képesek-e IL-10-et szintetizálni és szekretálni. Az egér modellel és a korai humán eredményekkel szemben később kiderült, hogy sem a keratinociták, sem a belőlük származó immortalizálódott sejtek nem képesek IL-10 termelésre [274, 275]. Ugyanakkor a transzkripció faktorok összetétele nem magyarázta, miért nem íródik át a humán IL-10 gén a laphámokban [276-278]. Ezért a kutatási tervezés idején azt feltételeztük, az IL-10 expresszió következetes, konzervatív hiánya az IL-10 gént tartalmazó kromatin állomány epigenetikai inaktivációjára utal. A kromatin inaktív állapotának kialakításában alapvető szerepet játszik a DNS metiláció, amely típusosan olyan citozinokon következik be, amelyeket guanin követ. Az egyedi CpG helyek számos gén promoterében megtalálhatók [88, 89]. A CpG metilációs szignál hatására a H3 és H4 hisztonok deacetilálódnak, ami az inaktív heterokromatin struktúra kialakulását segíti elő [90]

Kutatási cél

A proximális IL-10 promoter epigenetikai szabályzó mechanizmusok tanulmányozása a promoter CpG metilációs mintázata és a promoterhez kapcsolódó hiszton molekulák acetilációs állapotának vizsgálata alapján keratinocitákban, laphám eredetű sejtvonalakban.

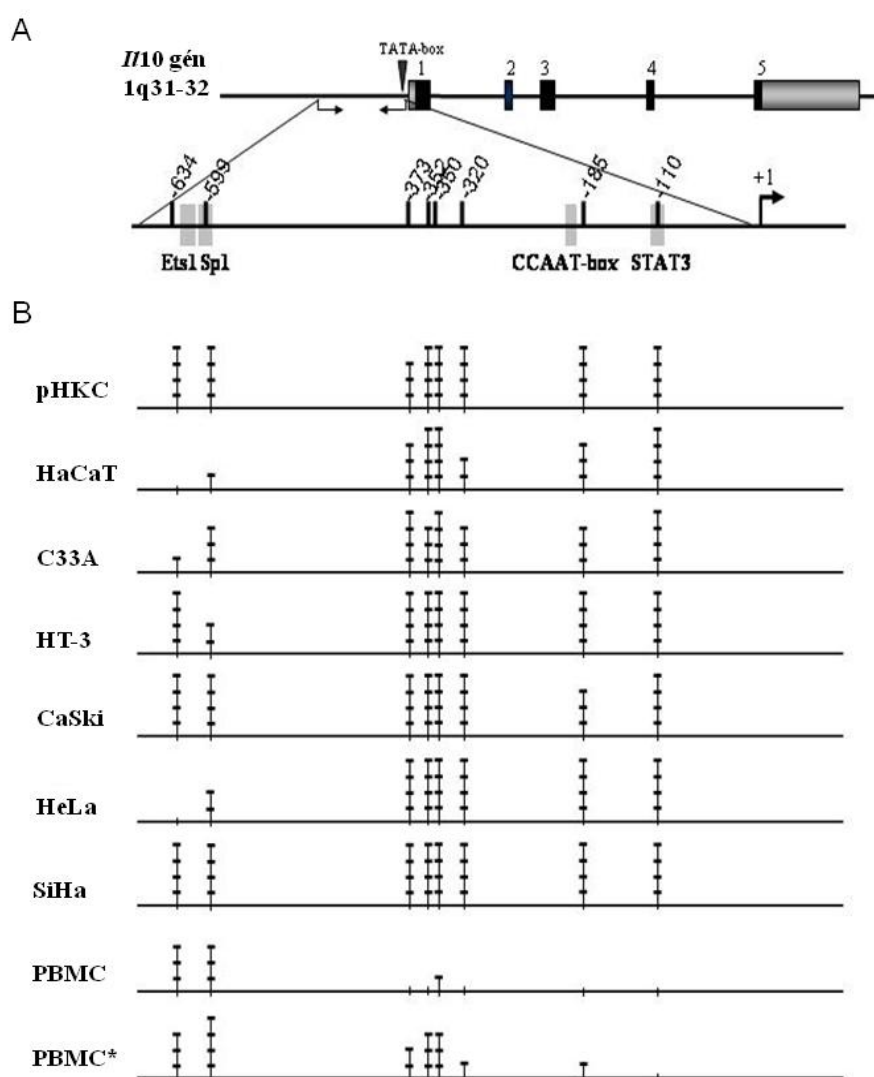
További célunk volt az IL-10 promoter CpG metiláció és az expressziós aktivitás összefüggésének vizsgálata in vitro modell rendszerben.

Sejtvonalak. Cervix carcinoma eredetű sejtvonalak, HeLa, SiHa, CaSki, C33A, HT-3. Keratinocita eredetű HaCaT sejtvonal ill. primer humán keratinociták. Az utóbbit speciális tápfolyadékban (Defined Keratinocyte serum-free Medium DK-SFM, Gibco, Karlruhe, Németo.) tartottuk fenn, míg a folyamatos sejtvonalakat DMEM tápfolyadékban.

CpG metiláció. Biszulfít modifikált genomi DNS szekvenálása alapján határoztuk meg a promoter CpG dinukleotidok metiláltságát [279]. A biszulfít kezelés következtében a nem metilált CpG citozinja timinné alakul, míg a metilált citozin védett az átalakulással szemben. A biszulfít modifikált DNS-t Sanger-féle szekvenálásnak vetettük alá és a szekvenálás termékeit lap formátumú poliakrilamid gélt alkalmazó szekvenáló készülékkel (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédo)

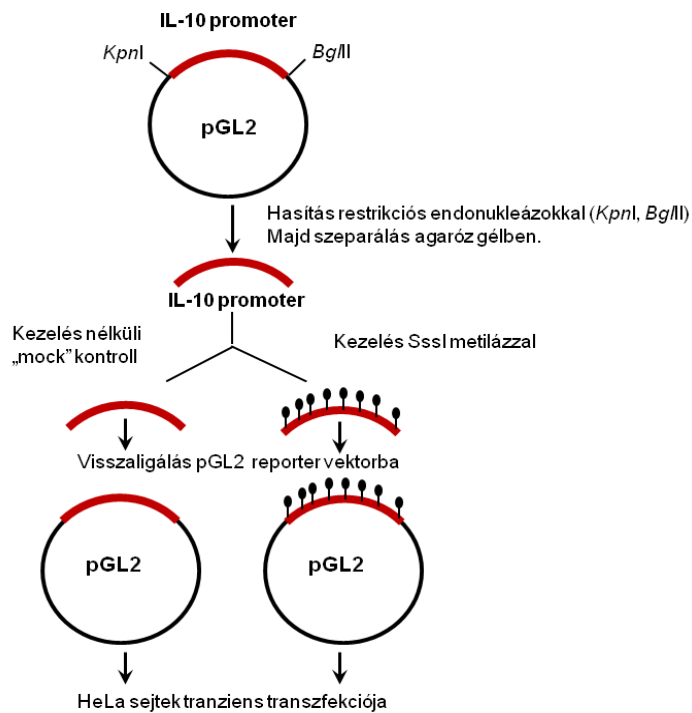
olvastuk le. Az elektroferogrammból szemikvantitatíven lehetett következtetni egy adott CpG pozíció metiláltságára.

Kromatin-immunprecipitáció. Primer keratinocitákban, valamint a folyamatos szaporodó HaCaT és HeLa sejtekben formaldehydes kezeléssel DNS-fehérje keresztkötéseket alakítottunk ki és a sejt-lizátumok ultrahangos kezelésével közel nukleoszóma méretűre fragmentáltuk a kromatint [280]. Az acetilált hiszton H3 és H4 tartalmú nukleoszóákat specifikus ellenanyaggal (Upstate Biotechnology anti-acetyl (K9, K14) histone H3 (06-599) antibody, anti-acetyl (K5, K8, K12, K16) histone H4 (06-866)) és Protein G agaróz gyöngyökkel izoláltuk. Következő lépésben valós idejű amplifikálással mértük meg, milyen mennyiségben kötődött IL-10 promotor szekvencia az acetilált, azaz aktív hisztonfehérjékhez.

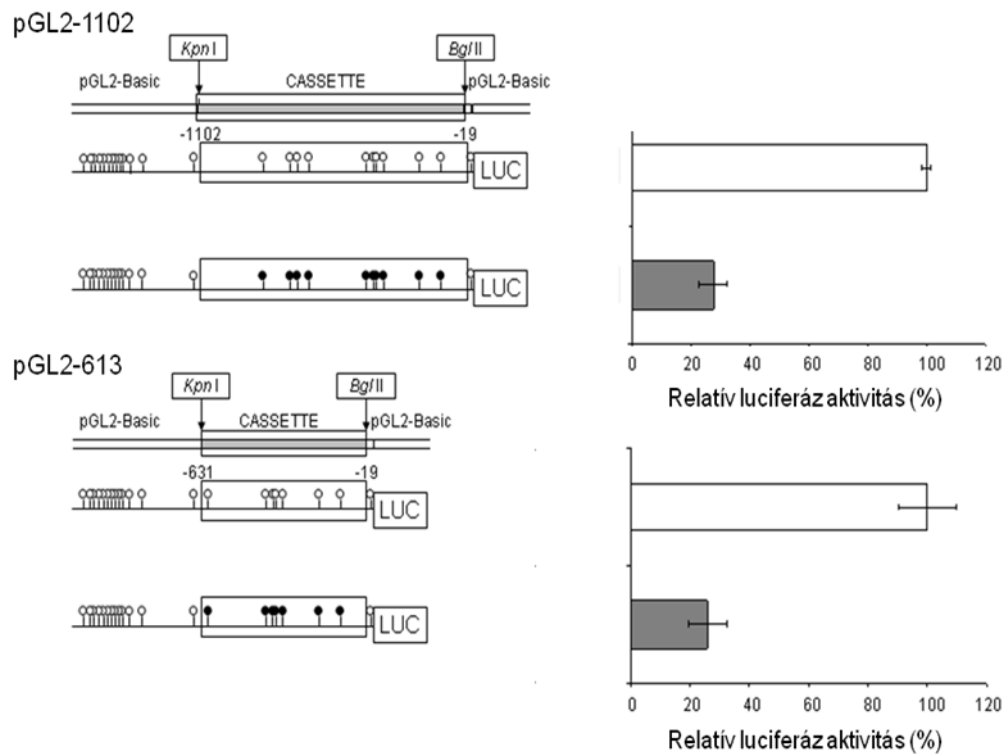


9. ábra Humán IL-10 promotor proximális régió CpG metilációs mintázata. (A) az IL-10 gén sematikus ábrázolása látható, +1: transzkripció kezdőpont, fekete doboz: transzlálódó szekvenciák, szürke doboz: nem transzlálódó mRNS szekvenciák. (B) citozin metiláció szemikvantitatív értékelése: nincs jel: 0%, 1 jel: <25%, 2 jel: 25-50 %, 3 jel: 50-75%, 4 jel: 75-100%, pHKC: primer humán keratinocita, PBMC: perifériás mononukleáris fehérvérsejtek PBMC*: köldökzsinórvér PBMC.

A.



B.



10. ábra IL-10 promotor metiláció vizsgálata metilációs kazetta módszerrel. (A) vizsgálati módszer a promotor kazetta szelektív CpG metilálására (B) a létrehozott konstrukciók metilált (fekete tárcsa) és nem metilált (üres tárcsa) CpG dinukleotidjainak hatása az expressziós rendszer luciferáz aktivitására. A hibaszávok reprezentatív kísérlet 3 párhuzamos mérésének szórását mutatják.

Eredmények

A proximális IL-10 promoter CpG metilációja

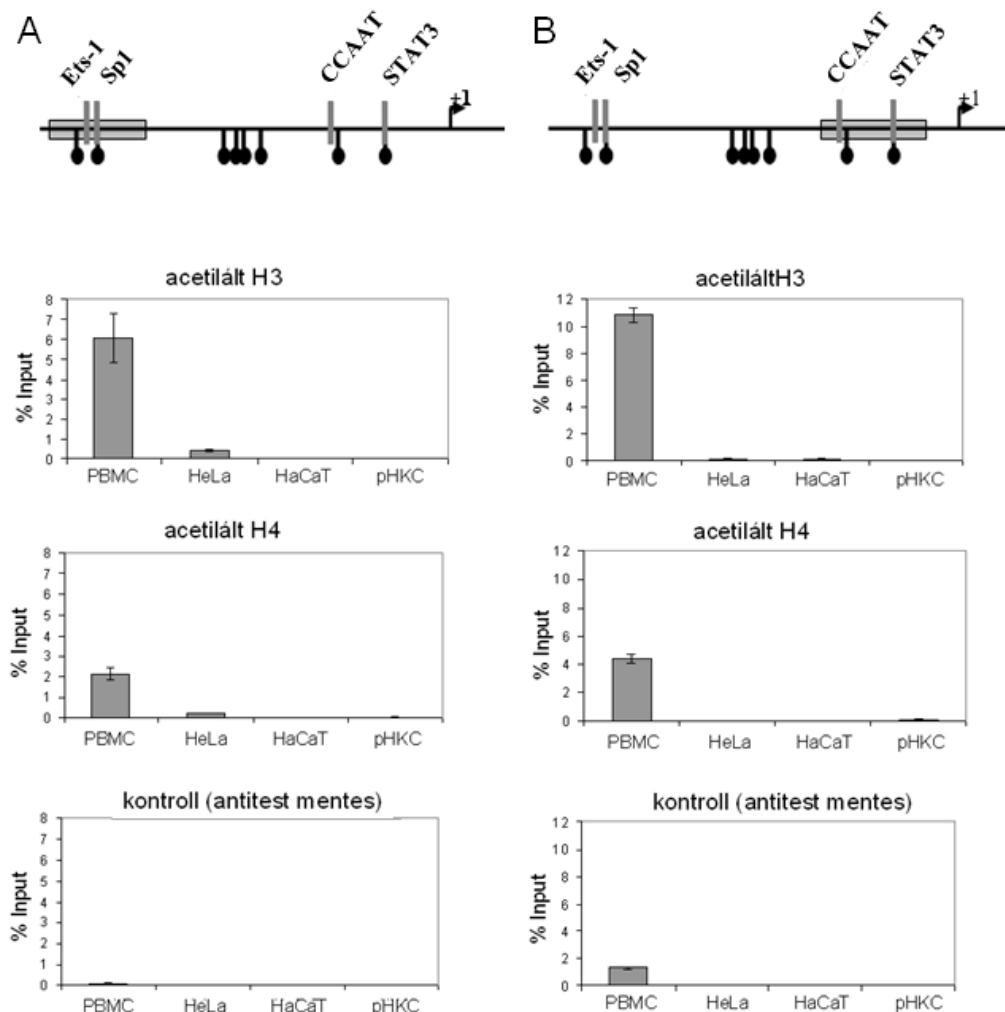
Reverz transzkripciót követő cDNS PCR módszerrel vizsgáltuk az IL-10 mRNS-t a fenti hámeredetű sejtvonalakban, de egyikben sem lehetett ilyen transzkriptumot kimutatni, Kontrollként perifériás mononukleáris sejtekben (PBMC) mutattuk ki az IL-10 mRNS-t, mind *ex vivo* állapotban, mind poliklonális (PHA) *in vitro* stimulálás után.

A proximális IL-10 promoterben 8 CpG hely található, amelyek a transzkripció kezdőpontjához viszonyítva -634, -599, -373, -352, -350, -320, -185 ill. -110 pozícióban helyezkednek el. A hat proximális CpG (-373, -352, -350, -320, -185 and -110) erősen metilált állapotú volt mind a primer keratinocitákban, mind a hámeredetű sejtvonalakban. A legproximálisabb helyzetű ₋₁₁₀CpG az összes vizsgált hám eredetű sejtben teljesen metilált volt, míg a perifériás mononukleáris sejtekben (PBMC) a kezeléstől függetlenül teljesen demetilált állapotban volt (**9. ábra**). A két disztális CpG (-634 és -599 pozíciók) metiláltsága változatos képet mutatott a sejtvonalakban. Összességében a két proximális CpG hely metiláltsága különítette el a specifikusan az IL-10 termelő és a nem expresszáló sejteket. A proximális CpG metiláltsága sejt kultúrákhoz hasonlóan teljes mértékű volt 3 donor exfoliált cervikális hámsejtjeiben és további 10 *cervix carcinomás* mintában is.

A fiziológiás és tumoros epiteliális eredetű sejtvonalak közül expressziósan aktív HPV genomot hordoz a Caski, HeLa, SiHa, míg a többi HPV negatív sejtvonal. A legproximálisabb helyzetű ₋₁₁₀CpG konzisztens metilációját a HPV hatástól függetlenül meg lehetett figyelni. A bemutatott eredményeken felül érdemes megjegyezni, hogy primer keratinocitákban HPV-16 E6 és E7 onkogének transzdukciója után is teljesen metilált volt a két proximális CpG.

CpG metiláció géncsendesítő hatásának in vitro kimutatása metilációs kazetta módszerrel

A vizsgálat elve, hogy olyan expressziós plazmidot hozunk létre, amelyben csak a vizsgálandó szakasz CpG dinuikleotidjai metiláltak (metilált kazetta). A proximális promoter -1102 és 14 valamint -613 és 14 pozíciók közé eső szekvenciáját klónoztuk pGL2-Basic expressziós plazmidba pGL2-1102 ill. pGL2-613 néven. A plazmid konstrukciókból jól reprodukálhatóan ki lehetett vágni a metilálandó kazettát, majd azt vizsgálalni (**10. ábra**). Az inszert metilálását SssI metilázzal végeztük, amelynek eredményességét restriktációs enzimekkel ellenőriztük. A ₋₁₁₀CpG beleesik a citozin metilációra nem érzékeny *MspI* és az citozin metilációra érzékeny izoskizomer *HpaII* restriktációs hasítóhelyébe. A promoter kazetta CpG metilálása után tranziens transzfekciós kísérletben vizsgáltuk az expressziós aktivitás változását. A proximális promoter 1,1 és 0,6 kb méretű kazettáinak CpG metilációja egyaránt gátolta az IL-10 promoter aktivitását (**10. ábra**).



11. ábra Az IL-10 promoter szakaszhoz kötődő hisztonok acetilációs állapotának kimutatása kromatin immunprecipitációs módszerrel perifériás mononukleáris sejtekben (PBMC), primer humán keratinocitában és HeLa, HaCaT sejtvonalakban. Az acetilált H3 ill. acetilált H4 hiszton molekulákhoz kötődő genomszekvenciák relatív mennyiségét valós idejű PCR módszerrel hasonlítottuk össze (% Input: a precipitátumba jutó szekvencia %-os aránya). A PCR kvantifikálást olyan szakaszokon végeztük -669–531 (A, szürke doboz) -233–70 (B, szürke doboz), amelyek az IL-10 expressziót befolyásoló transzkripció faktorok kötőhelyeit (szürke oszlop) tartalmazzák. A CpG dinukleotidokat fekete tárcsa jelzi. A hibásávok reprezentatív kísérlet 3 párhuzamos mérésének standard hibáját mutatják.

Az IL-10 promoter hiszton acetilációs állapota IL-10 termelő és nem termelő sejtekben

Az IL-10 promoter szakaszhoz kötődő hisztonok acetilációs állapotát kromatin immunprecipitációs módszerrel vizsgáltuk. A H3 és H4 hisztonok acetilációs állapota azt jelzi, hogy az adott genomszakasz az aktív eukromatinban vagy az inaktív heterokromatinban helyezkedik-e el. A módszer immunprecipitációs lépésében specifikus ellenanyagokkal fogtuk meg azokat a nukleoszóma fragmenteket, amelyekben a H3 ill. H4 molekulák acetilált állapotban voltak. A kvantifikációs lépésben valós idejű PCR reakcióban $\Delta\Delta\text{CT}$ módszerrel határoztuk meg, hogy az IL-10 promoter egyes szakaszai (-669–531 ill. -233–70) milyen arányban precipitálódtak az acetilált H3 ill. acetilált H4 tartalmú nukleoszómákban. A -669–531 promoter szakaszon Ets-1 és Sp1 transzkripció faktor kötőhelyek, valamint 2 CpG található, a -233–70 promoter szakaszon CCAAT-box and STAT-3

kötőhely [281] található a két proximális CpG hellyel együtt. Az IL-10 termelő és nem termelő sejtek a promoter hiszton acetilációs állapotában is markáns különbséget mutattak, a promoter legproximálisabb szakaszán az epiteliális sejtekben nem vagy csak nyomnyi mennyiségben lehetett acetilált hisztonokat kimutatni (**11. ábra**), ami arra utalt, hogy a keratinocitákban és a hámeredetű sejtvonalakban az IL-10 gén az inaktív heterokromatin állományba tartozik.

Megbeszélés

Az IL-10 szekréció alaposan szabályozott folyamat a szervezetben, myeloid és limfoid eredetű sejtek termelik [281, 282]. A cervikális karcinogenezis során lokálisan emelkedett IL-10 és csökkent IFN-gamma termeléssel járó immunológiai egyensúly felborulás alakul ki az infiltráló sejtek részéről [70]. Az IL-10 termelő sejtekben a promoterhez STAT3,14 SV40 promoter factor 1 (Sp1) [283, 284], CCAAT/enhancer binding protein b [285], and Ets-1 [286] transzkripció faktorok kapcsolódnak. Ezen transzkripció faktorok mind aktívak az epiteliális eredetű sejtekben is [276-278], amellyel egybevág saját megfigyelésünk, miszerint a CpG metilációtól mentes promoter kazettát tartalmazó expressziós plazmid valóban hatékonyan működött a HeLa sejtvonalban.

A CpG metiláció általában olyan hiszton modifikációkat eredményez, amelynek következtében az adott genomszakasz inaktív heterokromatin állapotba kerül. A kromatin immunprecipitációs vizsgálatunk az aktív eukromatin állapotban tartó H3 és H4 hiszton acetilációt csak a ténylegesen IL-10 termelő sejtekben mutatta ki. Érdeemes megemlíteni, hogy az IL-10₁₁₀CpG helye beleesik az egyik STAT3 kötőhelybe [287] és az irodalomból ismert humán glia fibrilláris protein (GFAP) példája, melynek promoterében a kötőhelyet érintő CpG metiláció közvetlenül is akadályozhatja a STAT3 bekötődését [93]. Szövetspecifikusan expresszáldó gének jelentős csoportjában a promoterek CpG szegények [288] és az evolúciósan azok a kritikus CpG helyek maradtak fenn, amelyek a szövetre vagy leszármazási vonalra specifikus epigenetikai csendesítésben vesznek részt. Ez a jelenség megfigyelhető olyan T-limfocita polarizációs citokineknél, mint az IFN-gamma, IL-2, IL-4 [91, 289]. A humán IL-10 promoterben is kis számban lehet CpG helyeket találni, 8 CpG fordul elő a proximális 700 bp szakaszban.

Vizsgálatainkban konzisztens CpG metilációs mintázatot figyeltünk meg *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalakban és biopsziákban. A normál epiteliális sejteket primer keratinocitákkal és az immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonallal modelleztük a különböző kísérletekben. Mivel ez utóbbi sejtek nem cervikális eredetűek, *ex vivo* exfoliált normál cervikális sejteket is bevontunk a CpG metilációs vizsgálatba. A CpG metilációs eredményeket összegezve a legproximálisabb₁₁₀CpG metilációja korrelált a legkövetkezetesebben az IL-10 expresszió hiányával, de a tőle disztálisan eső következő öt CpG hely metilációja is jó korrelált. A proximális IL-10 promoterhez kapcsolódó hisztonok acetilációs állapota szintén a 6 proximális CpG metilációjával korrelált.

A funkcionális vizsgálatokat tranziens transzfekciós rendszerben végeztük. A promoter kazetta CpG metilációja hatékonyan gátolta a promoter működését. A proximális 0,6 és 1,1 kb szakaszban

funkcionális különbséget nem tudtunk kimutatni, ami arra utal, hogy transzkripció kezdőhely szomszédságában elhelyezkedő szekvenciáknak kiemelkedő szerep jut a transzkripció és az epigenetikai szabályozásban [284, 285].

Következtetések

Az IL-10 gén proximális promoter szakaszán konzisztens CpG metilációs mintázat figyelhető meg *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalakban, valamint exfoliált hámsejtekben és *cervix carcinoma* biopsziákban. A metilációs mintázat legspecifikusabb eleme a legproximálisabb $-_{110}$ CpG, amelynek metilációs állapota korrelált a legkövetkezetesebben az IL-10 expresszió hiányával. Mind a fiziológiás, mind a neoplasztikus epiteliális sejtekben az IL-10 promoter CpG metilációja együtt jár a deacetilált hiszton struktúrával. Az IL-10 gén epigenetikusan inaktivált állapotát nem befolyásolja a HPV genom jelenléte vagy hiánya.

CpG metiláció a humán papillomavírus genomban

(Szalmás et al 2009. [290])

Más vírusokhoz hasonlóan, az onkogén HPV típusok szaporodását és az élővilágban fennmaradását szintén **permisszív fertőzés** biztosítja. Azonban az onkogén HPV típusok permisszív fertőzéséhez szükséges a sejtciklus indukálása az epiteliális gazdasejtben, ami a fertőzött sejtek egy részének kromatin állományában statisztikus módon instabilitást okoz. A változások mind a gazdasejt, mind a HPV örökítőanyagát érintik, kialakul a **transzformáló fertőzés** az alábbi következményekkel:

- Az onkogén HPV vírussal fertőzött hámsejt elveszti fiziológiás differenciálódó képességét, diszpláziássá, majd neopláziássá válik, az utóbbi önmagában is a permisszív HPV fertőzés megszakadásához és a virionképződés megszűnéséhez vezet.
- A kromatin instabilitása következtében a normál szövetek sejteire jellemző olyan tulajdonságok sérülnek, mint a homogén differenciálódás és a sejtszaporodás szigorú szöveti szabályozása. A gazdasejt autonómiáját növelő változások szelekciós előnyt jelentenek a környező szöveti sejtekkel szemben.
- A sejt autonómiájának fenntartásához esszenciális a sejtciklus aktívan tartása, amihez viszont a virális onkogének jelenléte szükséges a HPV indukált neopláziákban. A diszpláziás vagy már neopláziás cervikális hámsejt autonóm növekedéséhez szükséges optimális virális onkogén expressziót a virális genomban kialakuló **szomatikus genetikai** és **epigenetikai változások** véletlenszerűen kialakuló kombinációja biztosítja. Az egyik opcionális patomechanizmus a virális DNS metilációja.
- A papillomavirális onkogének expressziós szabályozása az **LCR** régión (**1. ábra 1. Bevezetés fejezet**) keresztül valósul meg, amely a virális E6 és E7 onkogének promoterét és enhancer szekvenciáit tartalmazza. A változások érinthetik mind az LCR régiót (regulációs target), mind az LCR régión keresztül ható effektor fehérjék megfelelő expresszióját.
- A papillomavirális onkogén expressziót fokozó ill. megfelelő szinten fenntartó **szomatikus genetikai** elváltozások több különböző mechanizmussal is károsíthatják a virális E2 fehérje szabályzó szerepét: A HPV genom **episzomális** állapotban képes produktív replikációra; a kromatin instabilitás miatt statisztikus módon integrálódik valamely gazdasejti kromoszómába, az **integrált** állapot gyakran együtt jár a virális E2 kódoló szakasz deléciójával vagy felszakadásával (ui. ott nyílik fel a cirkuláris genom) és az E2 visszacsatolás kiesésével [37, 38]. Ha megfelelő az E2 expresszió, az LCR szomatikus mutációi, deléciói, amelyek érintik az E2 kötőhelyeket, még mindig megakadályozhatják az fiziológiás szabályozást [39]. Ez utóbbi jelenség inkább az episzomális állapotú HPV-t hordozó neopláziás esetekben fordul elő, de néha az integrált HPV genomban is ilyen mechanizmussal sérül az E2 visszacsatolás.

- A HPV örökítőanyagára is érvényesek a gazdasejt **epigenetikai** szabályzó mechanizmusai. Az epitheliális gazdasejtet megfertőzve az episzomális HPV genom **eukromatin** állapotba kerül, ami lehetővé teszi, hogy nukleáris transzkripciós faktorok aktívan részt vegyenek a virális gének expressziójában a permisszív ciklus során [291, 292]. A permisszíven fertőzött sejtek mellett egyes fertőzött sejtek látens, nyugvó állapotba kerülnek CpG metilált HPV genommal és inaktív kromatinstruktúrával [292]
- *Cervix carcinomás* sejtvonalakban kimutatható a HPV genom **CpG metilációja** [293, 294]. A HPV genom több kópiában szokott beintegrálódni, de csak az egyik kópiáról íródnak át a papillomavirális onkogének, a többi epigenetikusan inaktiválódik [295, 296]. Ez jelenség a két legismertebb HPV-16 pozitív *cervix carcinoma* sejtvonal vonatkozásában is jól megfigyelhető, a >500 kópia integrált HPV-16 genomot hordozó Caski sejtvonalban 1-2 aktív HPV kópia mellett az többi inaktív és CpG metilációt mutat az LCR régióban, míg a 2 integrált kópiát hordozó SiHa sejtvonalban metilálatlan. A Caski inaktív HPV-16 genomi kópiáiban az LCR régió enhancer és a promoter szakaszain, metilálódnak a CpG dinukleotidok [291, 293]. A ~50 HPV-18 kópiát tartalmazó HeLa sejtvonalban szintén metilálódik a genomi kópiák többsége, míg a C4-I sejtvonalban hordozott néhány HPV-18 kópiát metilálatlan marad [297].
- A CpG metiláció nemcsak epigenetikai inaktiválódást indukál, hanem az aktív genomon is befolyásolhatja a transzkripciós faktorok működését. Az LCR régió CpG helyeinek jelentős része az E2 kötőhelyekben fordul elő, amelyeket mesterségesen metilálva lehet befolyásolni az LCR expressziós aktivitását [298, 299].
- A HPV genom CpG metilációjának szerepét többnyire HPV-16 és HPV-18 típusokra vizsgálták [291, 294, 296, 297], de a gyakori előfordulást mutató HPV-31 replikációs modelljében is kimutatták a hiszton modifikációk szerepét [292]

Kutatási cél

A virális genom CpG metilációs adatainak elemzése a méhnyak HPV fertőzéseiben, HPV által indukált lézióiban és malignomáiban

Elemzés

Az epigenetikai szabályozás szerepét kezdetben a fő szabályzó régióban az LCR-ben, valamint annak közvetlen szomszédságában (L1 ill. E6 szakaszok ideeső részében) vizsgálták [291, 296, 297], ezért a közleményünkben [290] végzett adatelemzés az LCR régióra vonatkozik. Összesen 149 invazív *cervix carcinoma*, 52 cervikális lézió és 107 aszimptomatikus fertőzés CpG metilációs adata állt rendelkezésre és azt vizsgáltuk, hogy az LCR egészében a metilált vagy nem metilált CpG helyek vannak-e többségben. Összességében az aszimptomatikus fertőzésekben dominált legmagasabb arányban (36%) CpG metiláció, amit az invazív *carcinomák* 21%-os és a HPV indukált léziók 17%-os

értéke követett. A CpG metilációt mutató aszimptomatikus fertőzésekben legnagyobb arányban az LCR enhancer szakasza volt metilált, de az enhanceré mellett az 5'LCR és promoter szakaszok metiláltsága is megmutatkozott néhány genomi klónban. A HPV-16 által indukált cervix carcinomás esetekben Caski és SiHa típusú CpG mintázatok lehetett megfigyelni, a HPV-18 által indukált cervix carcinomás esetekben pedig HeLa és C4-I típusút. A HPV-18 pozitív hámléziók közül a premalignus elváltozásokban tendenciaszerűen kezdett megjelenni *carcinomára* a CpG metiláció, míg az enyhe diszpláziás elváltozásokat inkább aktív, nem metilált víruskópiák jellemezték. A HPV-16 pozitív hámléziók adatai a fentebbi felosztást nem tették lehetővé, voltak köztük integrált több kópiára emlékeztető metilációs mintázatú, E2 kötőhelyeket érintő CpG metilációval járó, és metilátatlan esetek.

A klinikai mintákról rendelkezésre álló eredményeket az *in vitro* fenntartott sejtes rendszerekben megfigyelt jelenségek és a HPV genom állapota alapján értelmeztük: (i) A klinikai és citológiai szempontból aszimptomatikus mintákban vagy a normál HPV vírusciklus játszódik le transzkripciósan és replikációsan aktív, nem vagy csak részlegesen metilált episzomális virális genomról vagy látens fertőzés alakul ki inaktív, teljesen metilált szintén episzomális vírus genommal. (ii) A HPV indukált *invazív carcinomákban* nagyszámban integrálódott HPV genomok többsége metilációsan inaktivált, míg a sejtenként egy vagy néhány kópiában integrált HPV genomok metilátatlanok maradnak. (iii) A HPV által indukált enyhe diszpláziás hámléziókban az aktív episzomális HPV genom egy-egy CpG helyen metilált érintve akár E2 kötőhelyet is, míg a súlyosabb premalignus léziókban már egyes esetekben megjelenhet a több integrált genomi kópiára jellemző metilációs mintázat.

Megbeszélés

A fenti értékelésünkkel egybehangzó eredményeket mutatott be két évvel később egy olyan tanulmány, amely szövettani értékeléssel azonosított látens, permisszív és transzformáló HPV-16 fertőzött hámterületeket és azokban mikrodisszekciós izolálás után meghatározta az LCR CpG metilációját [299]. Látens fertőzésben a differenciálódó hám minden rétegében a HPV-16 LCR teljes szakaszán a CpG helyek valóban teljes mértékben metiláltak. Permisszív fertőzésben az 5'LCR szakasz egyáltalán nem metilált, az enhancer és promoter szakaszok a hámdifferenciálódáshoz kötött vírusciklus különböző szakaszaiban metilálódnak. Transzformáló fertőzésben az egyik korai esemény az E2 kötőhely metilációja és az azzal járó fokozott virális onkogén expresszió [299, 300].

A későbbiekben a szakma érdeklődése egyre jobban kiterjedt a HPV genom más területeire és más HPV típusokra is és számos klinikai tanulmány született, amelyek elsősorban a cervikális karcinogenezis korai és rákmegelőző elváltozásait, azaz a transzformáló fertőzési állapotot vizsgálták. A HPV-16 és HPV-18 típusok mellett vizsgálták a HPV-31 [301-303], HPV-33 [302] és HPV-45 [301, 303] típusokat. Az eredmények jól tükrözték, hogy transzformáló fertőzésben, ahol már nem termelődik új HPV virion, a kapszidot kódoló strukturális HPV génekben (L1, L2) a CpG helyek kiterjedt metilációja epigenetikai inaktiválódásra utal. A LCR régió CpG metilációja transzformáló

fertőzésben a strukturális génekénél jelentősen alacsonyabb mértékű [302, 303]. Az utóbbi jól tükrözi, hogy az LCR régióban olyan változások alakulnak és szelektálódnak ki, amelyek hatékonyan biztosítják a virális onkogének kifejeződését [299].

Az elemzés kísérleti hasznosítása [304]

HPV-31 fertőzésekben a virális LCR régió CpG metilációs mintázatának határoztuk meg második generációs szekvenálással.

Vizsgálati minták. Rutin HPV diagnosztikai vizsgálatra küldött exfoliált cervikális hámsejt mintákból 22 esetben azonosítottunk HPV-31 típust. Az eseteket két klinikai csoportba osztottuk: CIN2+ csoportba soroltuk 7 esetet, amely sebészeti eltávolítást eredményezett és a szövettan CIN2 vagy előrehaladottabb elváltozást igazolt; ≤CIN1 csoportba soroltunk 15 esetet, amelyben onkológiai jelentőségű elváltozás nem alakult ki a betegadatok követése alatt.

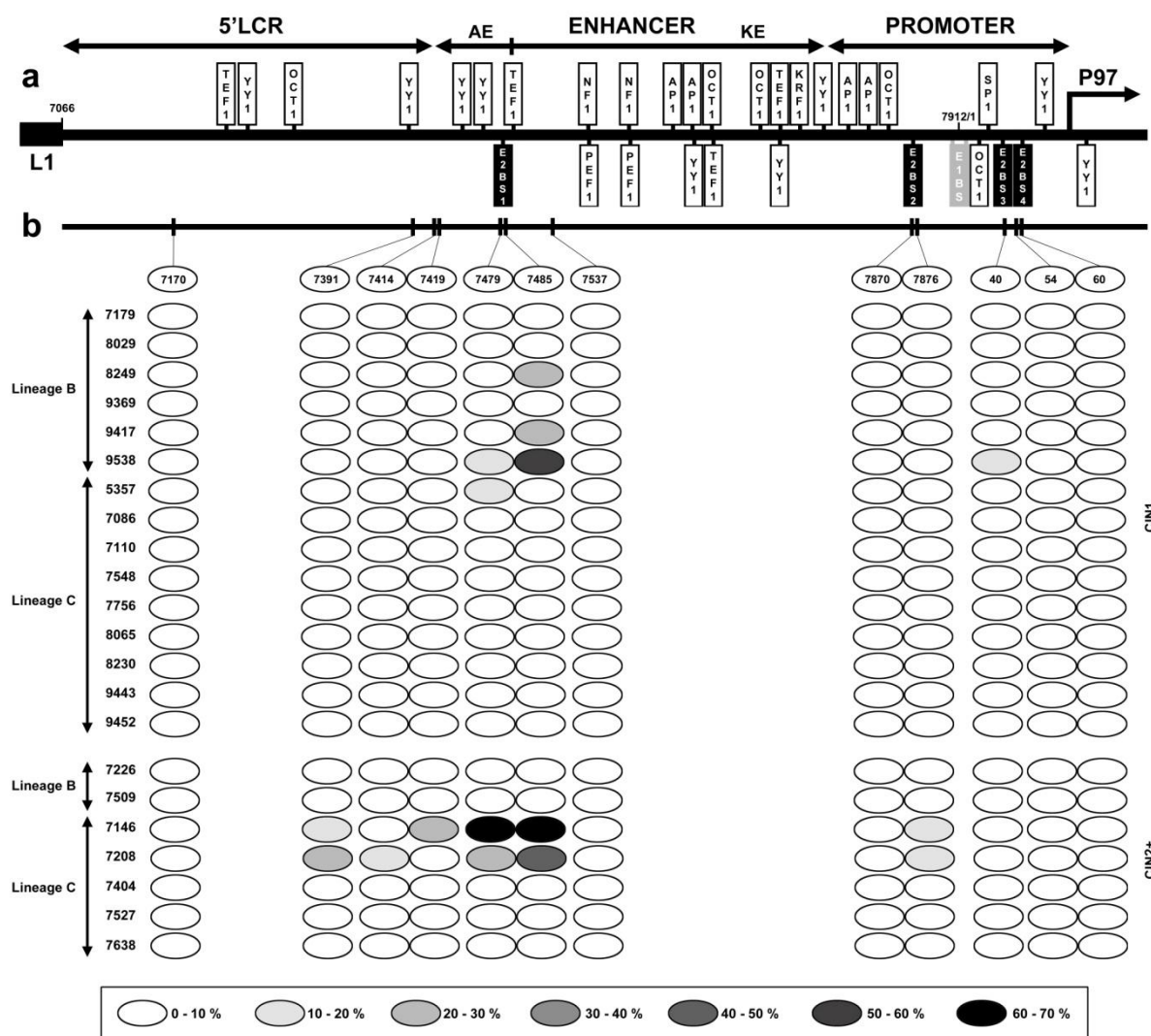
A továbbiakban a virális DNS-t vizsgáltuk és a HPV-31 altípusba sorolást munkacsoportunk korábbi közleményében [305] végeztük el, a hazai viszonyoknak megfelelően 14 esetben C, 8 esetben B altípus volt jelen. Az altípusok klinikai csoportosítás szerinti megoszlása a **12. ábra** látható.

Biszulfit modifikáció, PCR ampifikálás. A virális DNS-t Imprint® DNA Modification Kit (Sigma Aldrich) rendszerrel a gyártói utasítás szerint kezeltük. A biszulfit modifikált szekvenciára oligonukleotid PCR primereket terveztünk (**16. táblázat**). A PCR amplifikálás 25 µl végtérfogatban, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM oligonucleotid primer, 2.5 mM MgCl₂ végkoncentrációjú PCR puffer elegyben, 2.5 U of AccuTaq (Sigma Aldrich) polimeráz enzimmel történt 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) berendezésben a következő hőmérsékleti profillal 35 ciklusban: 94 °C 15'', 52 °C 45'', 68 °C 1'.

16. táblázat. PCR primerek biszulfít modifikált HPV-31 DNS amplifikálására

primer	primer szekvencia	primer pozíciója (nt)	termék hossz (bp)
PCR primerek – első kör			
7066-F	5'-AATGGATGTGTATGTAATATATGTG-3'	7066-7090	
345-R	5'-TATACCATCTAAATTCACCTT-3'	345-326	1192
PCR primerek – második kör			
7066-F	5'-AATGGATGTGTATGTAATATATGTG-3'	7066-7090	
7511-R	5'-ACTAACATATTTAAACAATACAACC-3'	511-487	446
7215-F	5'-TGTTATGTATGTTAATAAATATGTG-3'	7215-7237	
7806-R	5'-ACCTTAACAATTTAAACATATACAA-3'	7806-7782	592
7514-F	5'-AATTATGTTGATGTAGTAGTTT-3'	7514-7535	
81-R	5'-ATATACTTTATATACCAACCA-3'	81-61	480
7670-F	5'-TTGTAGTTTAATTATGTGTT-3'	7670-7689	
345-R	5'-TATACCATCTAAATTCACCTT-3'	345-326	588

Szekvenálás és adatelemzés. A PCR termékekhez adapterszekvenciákat illesztettünk, majd Agencourt AMPure XP - PCR Purification System (Beckman Coulter) mágneses gyöngy módszerrel tisztítottuk. DNS könyvtárat hoztunk létre GS Junior Titanium emPCR (Lib-A) Kit (Roche) rendszerrel a gyártói utasítások szerint. Ún. hosszú leolvasást végeztünk GS Junior Titanium Sequencing Kit (Roche) alkalmazásával GS Junior készülékben (Roche). A nyers adatokat GS Amplicon Variant Analyzer 2.9 szoftver segítségével illesztettük a biszulfít modifikált, metilálatlan HPV-31 referencia szekvenciához (GenBank accession number: J04353). Az *in vivo* metilált citozinok védve maradtak a biszulfít által okozott C/T konverziótól, az ilyen pozíciókban a szoftver azt adta meg hogy a leolvasott biszulfít módosított molekulákban milyen arányban fordult elő a citozin és timin, ami azt jelentette, hogy a fertőző HPV genomjainak adott pozíciójában ilyen arányban volt a citozin metilálva.



12. ábra. HPV-31 LCR metilációja klinikai mintákban. A metiláció mértékét színintenzitás jelzi

a: HPV 31 LCR szerkezete transzkripciós faktor kötőhelyekkel (L1 vége és P97 transzkripciós kezdőpont között), AE: segéd (auxiliary) enhancer, KE: keratinocita specifikus enhancer. Jelentősebb celluláris transzkripciós faktorok kötőhelyei (üres doboz), virális E1 és E2 fehérjék kötőhelyei (szürke ill fekete doboz).
b: CpG dinukleotidok elhelyezkedése és pontos pozíciója (ellipszisbe írt szám) a HPV 31 LCR régióban.

Eredmények. A kísérleti rendszerünkben mind a 12 CpG dinukleotidot (CpG pozíciók: 7170, 7391, 7414, 7419, 7479, 7485, 7537, 7870, 7876, 40, 54, 60) vizsgáltuk, amelyek a HPV-31 LCR régióban fordulnak elő. A 22 esetből 16-ban a teljes HPV-31 LCR régióban metilálatlan CpG helyeket találtunk (**12. ábra**). A promotor szakaszon két, az enhancer szakaszon négy, míg az 5'LCR szakaszon egy CpG pozícióban fordult elő metiláció. A metilált CpG pozíciók közül négy (7479, 7485, 7876, 40) E2 kötőhelyeken fordult elő. **Az LCR régióban CpG metilációt mutató hat klinikai mintában a CpG metiláció egyöntetűen érintette a disztális E2 kötőhely valamely vagy mindkét (7479, 7485) CpG helyét.** Ezzel szemben a proximális E2 kötőhelyek inkább hipometiláltak voltak, mindössze két mintában fordult elő metiláció a második, egy mintában a harmadik E2 kötőhelyben és mindhárom esetben megfigyelhető volt mellettük a disztális E2 kötőhely markáns CpG metilációja (**12. ábra**). A

CIN2+ csoporton belül négy esetben volt előrehaladott CIN3/CIS lézió, mind a négyben HPV-31 C altípus volt jelen. Közülük két eset hypometilált volt az LCR régió, míg a másik kettőben markáns CpG metiláció volt megfigyelhető. A $\leq$ CIN1 csoportban a CpG metiláció a disztális E2 kötőhelyre csoportosult.

Megbeszélés. A HPV-31 LCR régióját vizsgáló két korábbi tanulmány csak részlegesen fókuszált az LCR régióra, a teljes HPV DNS metilációját vizsgáló tanulmány [303] az HPV-31 LCR 12 CpG helyéből ötöt vizsgált, a másik tanulmány [302] az LCR régióban 8 CpG helyet vizsgált kiegészítve további CpG helyekkel az L1, L2 és E6 génekben. Mindkét vizsgálat az egyes CpG helyeknek a vizsgált betegcsoportokra vonatkozó átlagos metilációs százalékát adta meg. Ez az ábrázolás jól bemutatta az olyan tendenciaszerűen bekövetkező CpG metilációt, mint amilyen a késői L1 és L2 génekben alakul ki transzformáló fertőzés során. Ugyanakkor ezen ábrázolásmód az esetek kisebb részében opcionálisan kialakuló CpG metiláció értékelésére nem alkalmas, mert az egy-egy pozitív esetben előforduló magasabb metilációs százalék nem fog feltűnni, ha a nagyobb számú negatív esetek nulla százalékaival együtt átlagoljuk. Ezért mi tanulmányunkban a klinikai eseteket egyenként elemeztük és mintázatra vonatkozó megállapításokat a CpG metilációt mutató esetekre szűkítettük, amelyek a mi vizsgálatunkban is az esetek kisebb részét (27%) tették ki. Érdeemes megjegyezni, hogy a másik két HPV-31 tanulmányhoz [302, 303] nagyon hasonló eredményeket kaptunk mi is, amikor azokkal azonos módon próbáltuk ábrázolni a metiláció mértékét.

A CpG metilációs HPV vizsgálatok többségét is a leggyakoribb típus, a HPV-16 vonatkozásában végezték, míg az olyan egyéb onkogén típusokról, mint a HPV-31-ről kevés adat található a szakirodalomban. A HPV-31 a HPV-35 típussal együtt a HPV-16 legközelebbi rokona. A HPV-16 LCR régióban található 15 CpG helyből hét az E2 kötőhelyeken található, amelyekből a disztális magas affinitással, míg a proximálisak alacsony affinitással kötik a virális E2 proteint. Az E2 kötőhelyek CpG metilációja a papillomavirális onkogének kifejeződését fokozza [298, 299].

A HPV-31 LCR régióban található 12 CpG hely közül a HPV-16 típushoz hasonlóan hét található E2 kötőhelyen. Egy korábbi munkánkban [305] a HPV-31 variánsait vizsgáltuk klinikai mintákban. A három altípust (A, B, C) meghatározó szekvenciaeltérések egyike sem érint sem E2 kötőhelyet, sem azon kívül előforduló CpG helyet. Eredményeink szerint a citológiai atípiát okozó HPV 31 fertőzésekben a CpG metiláció opcionális, korlátozott gyakoriságú esemény, amely ha bekövetkezik, akkor elsődlegesen a disztális E2 kötőhelyen jelenik meg.

Következtetések

Irodalmi adatok értékelésével megállapítottuk, hogy a HPV genom fő szabályzó (LCR) régiójában a CpG metiláció nemcsak a gazdasejt transzformációja során következhet be, hanem az onkológiai elváltozásokkal nem járó fertőzések egy részében is megjelenik. Az utóbbi jelenséget látens fertőzési mechanizmusnak tulajdonítottuk. Az LCR régió CpG metilációját látens HPV fertőzésben később tőlünk függetlenül kísérletes klinikai tanulmányban célzottan is kimutatták.

A jelentős prevalenciával bíró HPV-31 típusban a virális onkogén expresszióért felelős LCR szabályzó régióban a CpG metiláció elsődlegesen a disztális E2 kötő helyen jelent meg.

Humán papillomavírus (HPV)-16 E7 onkoprotein aktiváló hatása Src non-receptor tirozin kinázokra

(Szalmás et al 2013 [306])

Az Src családba tartozó non-receptor tirozinkinázok megnövekedett aktivitása több daganat típusban az előrehaladott stádiummal és a metasztatikus potenciállal együtt járó jelenség. *Cervix carcinomás* tumorszövetekben is kimutatták aktiválódásukat és *cervix carcinomás* sejtvonalakban Src kináz inhibitorokkal csökkenteni lehet a sejtek motilitását és inváziós képességét [307, 308]. Az Src kinázok transz-autokatalitikus foszforilációval aktiválódnak [40] és a családnak három olyan tagja van, az Src, a Fyn és a Yes, amelyek ubikviter módon számos sejttypusban, többek között a keratinocitákban is jelen vannak. Mivel a HPV permanens onkogén hatása szükséges a malignus fenotípust meghatározó celluláris folyamatok fenntartásához [309], feltételeztük, hogy a keratinocita Src kinázok expresszióját vagy aktiválódását befolyásolják a HPV onkoproteinjei.

Kutatási cél

Az Src, a Fyn és a Yes kinázok expressziójának vizsgálata mRNS és fehérje szinten HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek jelenlétében.

Az Src, a Fyn és a Yes kinázok tirozin foszforilációs aktiválódásának vizsgálata HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek jelenlétében.

A keratinociták differenciációjának és a HPV onkoproteinek hatása az Src-kinázok expressziójára és foszforilált állapotára

Sejtvonalak. Primer humán keratinocitákba LXS_N retrovírus vektor segítségével transzdukáltuk a HPV-16 E6 és E7 onkogéneket [200]. A sejteket szérummentes kalciumban szegény tápfolyadékkal tartottuk osztódó, proliferációs állapotban, a többrétegű laphámban ez az állapot a bazális rétegre jellemző. A többrétegű laphámok *stratum spinosum* rétegére jellemző differenciálódást borjúsérummal és megemelt kalcium szinttel értük el.

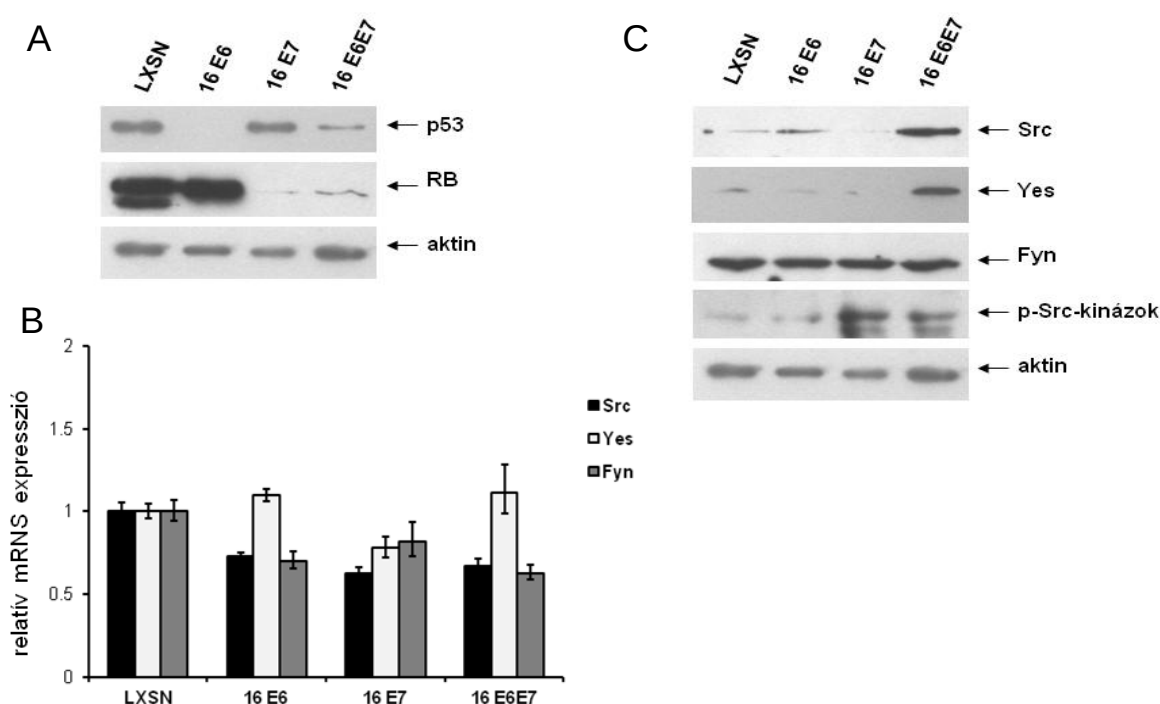
Expressziós vizsgálatok. Az Src, a Fyn és a Yes transzkripciójának relatív mértékét valós idejű kvantitatív PCR módszerrel mértük. Fehérje szinten Western-blot vizsgálatban mutattuk ki az Src, a Fyn és a Yes jelenlétét és a HPV onkoproteinek eredményes transzdukcióját jelző p53 és pRb jelentős mennyiségi változásait.

Protein foszforiláció. Az Src kináz család tagjainak foszforilációs állapotát Human Phosphokinase Array Kit alkalmazásával vizsgáltuk. A módszerrel 45 különböző fehérje tirozin ill. szerin foszforilációját lehet kimutatni. Az egyes fehérjék foszforilációját kör alakú színreakció jelezte, amelyek egymáshoz viszonyított jelerősségét denzitometriával becsültük meg.

Eredmények

HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok expressziójára

A rekombináns LXS_N retrovírus vektorral transzdukált primer keratinocitákban a HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek funkcionális jelenlétét a legfontosabb célfehérjékön kifejtett hatásukkal igazoltuk. Az E6 fehérjét kifejező sejteket a p53 celluláris szintjének jelentős csökkenésével igazoltuk, míg az E7 fehérjét kifejező sejteket a pRB hasonló változása jelezte (**13. ábra**).

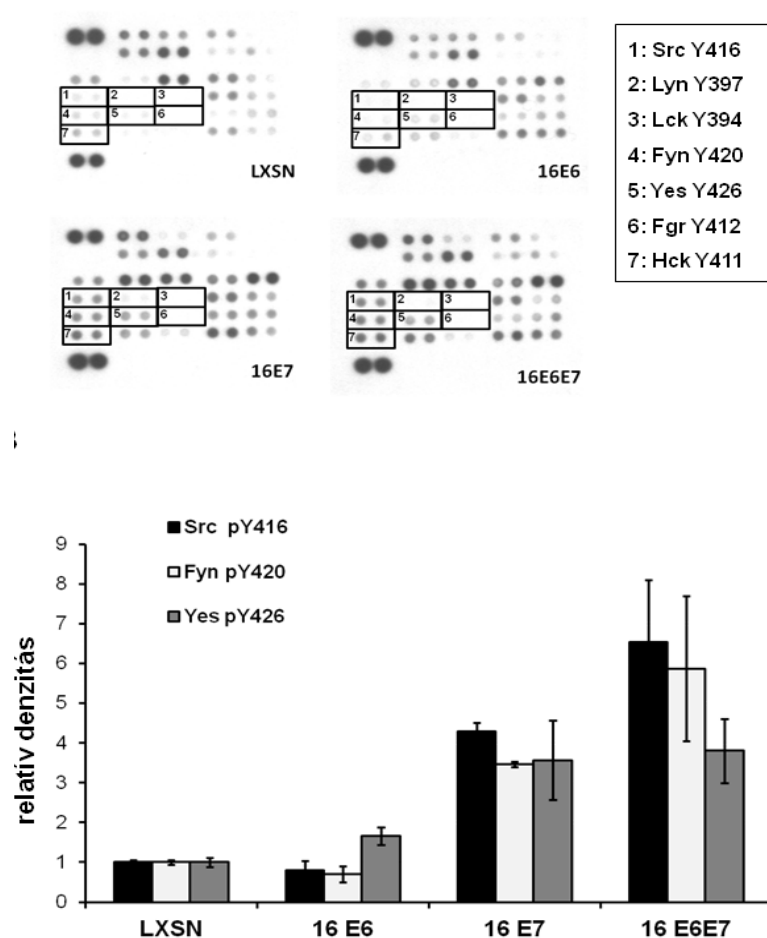


13. ábra HPV-16 E6 és E7 onkogének hatása az Src kinázokra. (A) a transzdukált HPV onkogének funkcionális ellenőrzése a p53 ill. pRB célfehérjéken Western blot módszerrel (B) az Src, a Fyn és a Yes relatív transzkripció aktivitása GAPDH endogén mRNS kontrollhoz viszonyítva (C) az Src, a Fyn és a Yes kinázok valamint ⁴¹⁶Y foszforilált formájuk (p-Src-kinázok) kimutatása Western blot módszerrel. (LXS_N: vektor kontroll; E6, E7: E6 ill. E7 hatása önmagában; E6E7: E6 és E7 együttes jelenlétében). A hibasávok két független kísérlet 3-3 párhuzamos mérésének standard hibáját mutatják.

A funkcionális HPV onkoproteinek jelenlétében vizsgáltuk az Src, a Fyn és a Yes kinázokban tapasztalható változásokat. Míg transzkripció szinten nem volt kimutatható hatásuk a HPV-16 onkoproteineknek, addig fehérje szinten expressziós különbségeket mutattunk ki az Src kináz családon belül. A Fyn a HPV-16 onkoproteinektől függetlenül konstitutívan expresszáldott. Az Src és a Yes proteinek celluláris szintje viszont markánsan megemelkedett a HPV-16 E6 és E7 papillomavirális onkoproteinek együttes jelenlétében. Az Src kinázok tirozin foszforilációs aktiválódását Western-blot és Human Phosphokinase Array módszerekkel vizsgáltuk. Az előbbiben az Src kinázok 416Y

foszforilációját a kinázcsalád szintjén vizsgáltuk és kimutattuk, hogy a HPV-16 E7 onkoprotein jelenlétében a jelenlévő Src kinázok közül legalább egy jelentősen aktiválódik (**13. ábra**)

HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src családba tartozó kinázok tirozin foszforilációjára

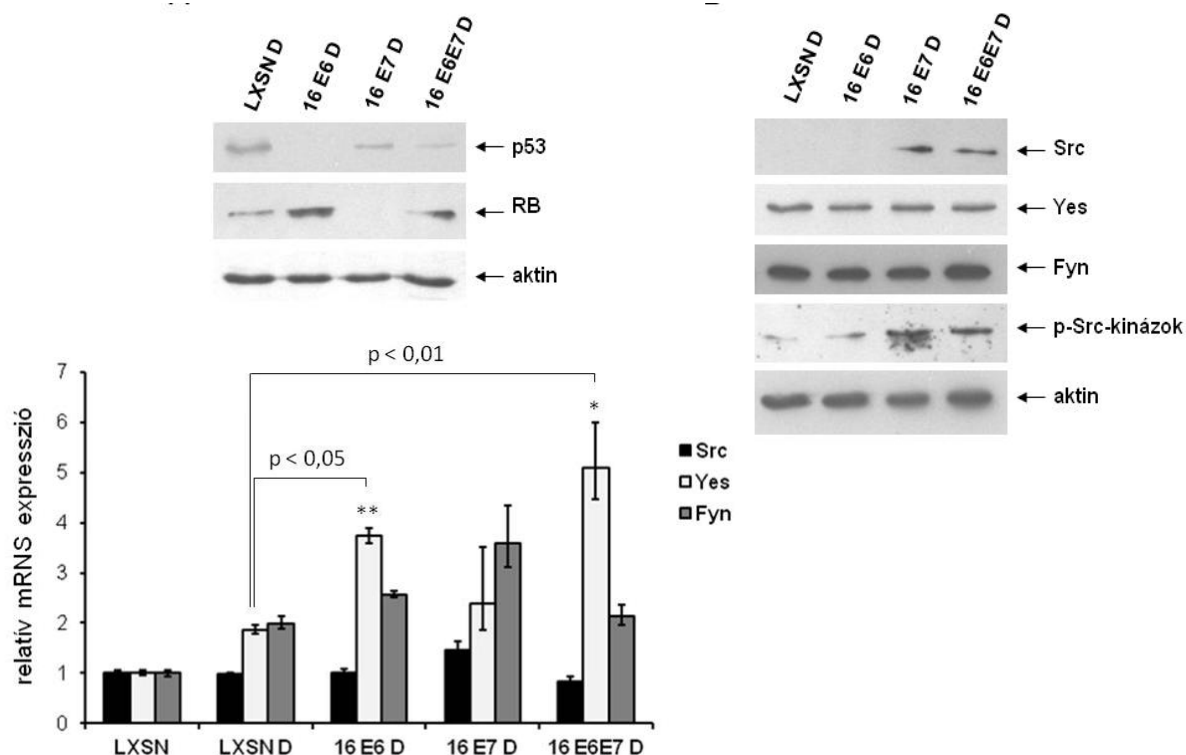


14. ábra HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek hatása a tirozin és szerin foszforilációra *Human Phospho-Kinase Array* módszerrel vizsgálva. (LXSN: vektor kontroll; E6, E7: E6 ill. E7 hatása önmagában; E6E7: E6 és E7 együttes jelenlétében) Az ábra felső részén az array vizsgálat elrendezése látszik, az Src kinázok lokalizációját számozott keretek jelzik. Az ábra alsó részén az oszlopgrafikon az Src, a Fyn és a Yes kinázok tirozin foszforilációját jellemző relatív jeldenzitást mutatja be. A hibásávok két független kísérlet 2-2 párhuzamos mérésének standard hibáját mutatják.

Az expressziót fehérje szinten mérő Western-blot vizsgálatokban általánosságban tudtuk kimutatni az Src kinázok foszforilációs aktiválódását. Az Src kináz családon belül foszfokináz array módszerrel vizsgáltuk az egyes kinázokat és kimutattuk, hogy a HPV-16 E7 onkoprotein jelenlétében az Src, a Fyn és a Yes foszforilációja egyöntetűen fokozódott. Az E6 onkoproteinnek nem volt ilyen hatása egyik Src kinázra sem (**14. ábra**). A foszfokináz array meghatározással szintén alátámasztottuk a papillomavirális onkoproteinek funkcionális jelenlétét a kísérleti rendszerünkben, ugyanis az E7

jelenlétében a p53_{15S} foszforilációja megemelkedett, míg az E6 jelenlétében a foszforilált p53 szintben is ki lehetett mutatni a csökkenést [306]

HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src-kinázokra differenciálódó humán keratinocitákban



15. ábra HPV-16 E6 és E7 onkogének hatása az Src kinázokra differenciálódó (D) keratinocitákban. (A) a transzdukált HPV onkogének funkcionális ellenőrzése a p53 ill. pRB célfehérjéken Western blot módszerrel (B) az Src, a Fyn és a Yes relatív transzkripció aktivitása GAPDH endogén mRNS kontrollhoz viszonyítva (C) az Src, a Fyn és a Yes kinázok valamint 416Y foszforilált formájuk (p-Src-kinázok) kimutatása Western blot módszerrel. (LXSND: vektor kontroll; E6, E7: E6 ill. E7 hatása önmagában; E6E7: E6 és E7 együttes jelenlétében). A hibasávok két független kísérlet 3-3 párhuzamos mérésének standard hibáját mutatják. A szignifikancia szintet két oldalú T próbával számítottuk ki.

A szérumban jelenlétében és megemelt kalcium koncentráció hatására a keratinocitákban megjelenő differenciációs markereket, transzglutamináz-1, involucrin a korábbi közleményünkben leírtaknak megfelelően ellenőriztük [200]. A differenciálódó keratinocitákban is kimutattuk az E6 ill. E7 onkoproteinek funkcionális jelenlétét a p53 és pRB célfehérjék vizsgálatával. A differenciálódás önmagában is megemelte a Yes kináz expressziót mind mRNS, mind fehérje szinten. Az Src kinázra viszont differenciálódó körülmények között is a HPV-16 hatott (**15. ábra**) hasonlóan a proliferáló keratinocitákhoz (vö. **13. ábra**) azzal a különbséggel, hogy az E7 differenciálódó sejtekben önmagában is elegendő volt az Src kináz szintjének növelésére, míg proliferáló sejtekben csak az E6 onkoproteinnel együtt volt ilyen hatása. A HPV-16 E7 onkoprotein Src tirozin foszforilációs hatását a kináz család szintjén nem befolyásolta a gazdasejt differenciálódása. Az mRNS mennyiségi

vizsgálatok alapján a HPV-16 differenciálódó sejtekben is poszttranszkripció módjára hat az Src kinázra.

Megbeszélés

Az onkogén humán papillomavírusok E6 és E7 onkoproteinjei számos celluláris fehérjével lépnek kölcsönhatásba a p53 ill. a pRb fehérjék mellett [32]. Az utóbbiakat jól fel lehet használni arra, hogy a kísérleti modellben a HPV onkoproteinek funkcionális jelenlétét igazoljuk. A humán papillomavírusok természetes szaporodási ciklusa érinti mind a proliferálódó bazális laphámsejteket, a felsőbb laphámrétegek differenciálódó sejtjeit. A projektben alkalmazott kísérleti rendszerünk alkalmas mindkét állapot modellezésére [200]. Az Src kinázok fokozott aktivitását többféle malignus daganatban [310-312], többek között *cervix carcinomában* is kimutatták [307]. A projektben azt vizsgáltuk, hogy a cervikális karcinogenezist elindító és fenntartó papillomavirális onkoproteinek milyen módon befolyásolják az Src non-receptor tirozinkinázok expresszióját és aktivitását. Az immortalizálódott sejtekben mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között kisselektálódnak legjobb proliferációs képességet biztosító szomatikus genetikai, génexpressziós elváltozások. Az utóbbiak zavaró hatásának minimalizálása miatt a kísérleteinket a transzdukciót követő 5-8 passzázs alatt végeztük, amely alatt nem volt várható az eredményeinket befolyásoló véletlen szomatikus elváltozás kisselektálódása.

A keratinocitákban Src kinázcsaládon belül expressziós heterogenitást figyeltünk meg. A differenciálódás önmagában is fokozta a Yes és a Fyn transzkripcióját, a Yes esetében a fokozott transzkripció hatását fehérje szinten is ki lehetett mutatni. A papillomavirális onkoproteinek közül csak az E6, csak differenciálódó körülmények között és csak a Yes kinázra fejtett ki szignifikáns transzkripció hatást. Protein szinten a konstitutív Fyn expresszió mellett az Src és a Yes jelenlétére a papillomavirális onkoproteinek és a differenciálódás kombinált hatását figyeltük meg. Az expressziós heterogenitás mellett viszont a tirozin foszforilációs aktiválásban egységesen az E7 onkoprotein játszott szerepet. Az Src kinázok potenciális kemoterápiás célpontok. *Cervix carcinoma* eredetű sejtvonalak proliferációs aktivitása csökkenthető az Src transzkripció gátlásával [307] és Src kináz inhibitorral [42]. Src kináz inhibitorral a sejtvonalak inváziós képessége is csökkenthető [308]

Következtetés

A proliferálódó keratinocitákban a non-receptor Src tirozinkinázok közül a Fyn konstitutív módon jelen van, míg az Src és Yes szintje HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek együttes jelenlétében növekszik meg. Az E7 onkoprotein további hatása, hogy tirozin foszforilációs mechanizmussal fokozza a jelenlévő Src kinázok aktivitását mind a proliferálódó, mind a differenciálódó laphámsejtekben.

Humán herpesvírusok előfordulása periodontitis apicalisban

(Hernádi et al 2010 [313], Hernádi et al 2011 [314])

A fog gyökércsúcsa körüli fogágysszövetek gyulladása, a *periodontitis apicalis* jellemzően kevert mikrobiális fertőzés következtében alakul ki, anaerob Gram-negatív endodonto-patogén baktériumok játszanak a vezető szerepet a folyamat kialakulásában. Az anatómiai és szövettani viszonyok miatt a szervezet nem tudja eradikálni a folyamatot. A krónikussá váló lokalizált gyulladás és a szervezet között kialakult patológiás egyensúly felborulása a *periodontitis apicalis* akut fellángolásához vezet [165]. Az utóbbiban felmerült az Epstein-Barr vírus (EBV, *Gamma-herpesvirinae* alcsalád) és a humán cytomegalovírus (HCMV, *Beta-herpesvirinae* alcsalád) patogenetikai szerepe [171-173]. Az említett herpesvírus alcsaládok humán tagjaira jellemző, hogy a primer fertőzés is és a többé-kevésbé rendszeresen bekövetkező vírusürítés is jellemzően a száj és garat nyálkahártyáján keresztül zajlik le.

Kutatási cél

Béta- és gammaherpesvírusok előfordulását, halmozódását és aktivitását vizsgálni a periodontitis apicalis különböző klinikai formáiban

Prospektív, eset-kontroll klinikai vizsgálat. 40 periapikális léziót gyűjtöttünk prospektíven olyan betegektől, akik egy vagy több fogon szájsebészeti apikotómiára szorultak a hagyományos gyökérkezelés sikertelensége miatt. További beválogatási kritérium volt a beteg kielégítő általános állapota és súlyosabb szisztémás betegségek hiánya az Amerikai Aneszteziológiai Társaság által kiadott szempontok szerint, valamint a vizsgált fog *marginalis periodontium*ában nem lehetett gyulladás (szondázási mélység ≤ 4 mm). A kontroll csoport 40 impaktált bölcsességfog gyulladás- és szuvasodásmentes pulpája volt. Az érintett bölcsességfogakat *pericoronitis* vagy szekunder fogtorlódás miatt kellett eltávolítani.

A periapikális léziókat a radiológiai méret alapján ≥ 5 mm és < 5 mm csoportokba osztályoztuk, a fogakat pedig panaszmentes és panaszos csoportokba. Akkor soroltuk az utóbbiba a fogat, ha az akutan fájt, ráharapásra vagy kopogtatásra fájdalmat jelzett vagy a gyökércsúcs felőli nyálkahártya nyomásérzékeny volt. A feldolgozásig -70°C hőmérsékleten fagyasztott mintákból DNS-t és RNS-t izoláltunk, a vírus genomi DNS-ét PCR amplifikálással, az EBNA fehérjék közös leader szakaszáról átíródott virális mRNS-t reverz transzkripciót követő PCR amplifikálással mutattuk ki. A vizsgált vírusok halmozódását, génexpressziós aktivitását egyrészt a kontroll csoporthoz viszonyítottuk, másrészt a fentebb részletezett esetcsoportok között hasonlítottuk össze.

Eredmények

Az összes periapikális lézió 72%-ban mutattuk ki az Epstein-Barr vírus (EBV) jelenlétét, míg a kontroll mintákban csak elenyésző arányban fordult elő. Az esetek jelentős részében, az összes minta felében génátírást is ki lehetett mutatni a járulékos EBNA antigéneket kódoló genomi régióról. A kontroll mintákhoz viszonyítva mindkét mind genomi DNS, mind transzkripció szinten szignifikánsnak bizonyult az EBV halmozódása a periapikális léziókban. (17. táblázat).

17. táblázat Epstein-Barr vírus (EBV) genomi DNS és EBNA mRNS előfordulása a periapikális léziókban

	EBV DNS	EBNA mRNS
periapikális lézió (n=40)	29 (72%)*	20 (50%)*
panaszos (n=17)	14 (82%)*	12 (71%)*
panaszmentes (n=23)	15 (65%)*	8 (35%) [#]
lézióméret ≥5mm (n=21)	19 (91%)*	16 (76%)*
lézióméret <5mm (n=29)	10 (53%)*	4 (21%) ⁺
kontroll minták (n=40)	1 (2,5%)	1 (2,5%)

*p<0,0001, [#]p<0,001, ⁺p<0,05 a kontrollokhoz viszonyítva

A periapikális léziókat tovább csoportosítottuk panaszosság ill. radiológiai lézióméret szerint és minden alcsoportban mindkét EBV marker szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mint a kontrolloknál. Az előfordulási arányok mindazonáltal magasabbak voltak, ha a lézió panaszt okozott a betegnek, vagy ha nagyméretű volt.

Maga a lézióméret is hatással van a panaszosságra és adataink is arra utaltak, hogy a nagy lézióméret és a panaszos megnyilvánulás tendenciaszerűen együtt fordul elő (**18. táblázat** (19. táblázat)), ezért az EBV markerek és lézióméret együttes kockázatát vizsgáltuk logisztikus regressziós analízissel. Az egyváltozós analízis alapján az EBNA mRNS és a nagy lézióméret tűnt a panaszosság kockázati tényezőjének. Ezért a többváltozós analízisben az EBNA mRNS-t a lézióméretre, a lézióméretet pedig az EBNA mRNS-re standardizáltuk.

18. táblázat. Periapikális léziók panaszos megnyilvánulásának kockázati tényezői (OR[esélyhányados], 95% konfidencia intervallum értékkel)

független változó	lézió n	panaszos n (%)	nyers OR (CI_{95%})[#]	tisztított OR (CI_{95%})[#]
A.				
lézióméret				
< 5 mm	19	4 (21%)	1.0 (ref)	1.0 (ref)
≥ 5 mm	21	13 (62%)	6.09 (1.49-24.99) p=0.01	4.02 (0.81-19.89) * p=0.08
EBV DNS				
neg.	11	3 (27%)	1.0 (ref)	1.0 (ref)
poz.	29	14 (48%)	2.49 (0.55-11.30) p=0.24	1.11 (0.19-6.18) ** p=0.90
EBNA mRNS				
neg.	20	5 (28%)	1.0 (ref)	1.0 (ref)
poz.	20	12 (60%)	4.50 (1.17-17.37) p=0.03	2.29 (0.48-11.06) ** p=0.30
B.				
független változók kombinációja				
méret mRNS_{EBNA}				
<5mm ∩ neg.	15	3 (20%)	1.0 (ref)	n.a.
<5mm ∩ poz.	9	3 (33%)	1.99 (0.31-13.06)	n.a.
vagy ≥5mm ∩ neg				
≥5mm ∩ poz.	16	11 (69%)	8.80 (1.69-45.76) p=0.027^{##}	n.a

Standardizálás *EBNA mRNS-ra ill. **lézióméretre., n.a. nem alkalmazható, [#]95 % konfidencia intervallum a hozzátartozó p értékkel, ^{##}p for trend érték.

Az egymásra standardizálás mind a lézióméret, mind az EBNA mRNS esélyhányados értékét csökkentette és a tisztított esélyhányadossal (OR) jellemzett kockázat szignifikanciáját is erodálta (**18. táblázat**). Ez alapján feltételeztük, hogy a két tényező együttes jelenléte határozza meg a panaszosság kockázatát. Az eseteket három csoportra bontottuk, az első csoportban egyik rizikótényező sem volt

jelen, az elemzésben ez volt a referencia csoport, a második csoportban a két rizikótényezőből csak az egyik volt jelen, míg a harmadik csoportot mindkét rizikótényező megléte jellemezte. Az eredmények alapján az EBNA transzkripció és a nagy lézióméret együttes előfordulása jelentett szignifikáns 8,8× kockázatot a panaszos manifesztációra (**18. táblázat**).

19. táblázat Bétaherpesvírus DNS előfordulása periapikális léziókban

	HCMV	HHV-6A	HHV-6B
periapikális lézió (n=40)	4	4	4
lézióméret <5mm			
panaszmentes(n=15)	1	2	0
panaszos (n=4)	0	1	0
lézióméret ≥5mm			
panaszmentes (n=8)	2	1	0
panaszos (n=13)	1	0	4*
kontroll minták (n=40)	0	1	0

*p<0,05 a kontroll mintákhoz viszonyítva

A bétaherpesvírusok előfordulási aránya az EBV-nél lényegesen alacsonyabb volt (19. táblázat) és virális mRNS expresszió sem volt kimutatható. A HCMV, a HHV-6A és a HHV-6B előfordulása azonos (10%-os) arányúnak bizonyult. Közülük a HHV-6B szignifikáns összefüggést mutatott a klinikai típussal, mind a négy HHV-6B fertőzés nagyméretű panaszos lézióban fordult elő. A HHV-6A és a HCMV előfordulása megoszlott a klinikai típusok között és panaszmentes periapikális léziókban is előfordultak.

A HCMV és a HHV-6 vírusok elsősorban olyan mintákban lehetett kimutatni, amelyben az EBV is jelen volt. Kilenc mintában volt koinfekció, egy hármass EBV-HCMV-HHV-6 koinfekciót észleltünk, hat esetben HHV-6, két esetben HCMV fordult elő az EBV mellett. Minden koinfekcióban aktív EBNA expresszió volt megfigyelhető. EBV monoinfekció 20 mintát érintett, HCMV ill. HHV-6A monoinfekció egy-egy mintában fordult elő. A mono- és a koinfekciós minták között nem volt szignifikáns különbség a panaszos klinikai manifesztációban (41% vs. 56%, p=0,73). A vizsgálatot később kiterjesztettük a másik humán gammaherpesvírusra, a HHV-8-ra is, de HHV-8 DNS-t nem lehetett egyik periapikális lézióban sem kimutatni (20. táblázat) [315]

Megbeszélés

A *periodontitis apicalis* és az EBV kapcsolatát korábban részben EBNA mRNS detektálásán keresztül [172, 173, 178, 179], részben pedig az LMP fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával igazolták [316]. Mind az EBNA mRNS, mind az LMP fehérjék jelenléte az EBV III. típusú látencia fázisára utal, amelyben ugyan vírusreplikáció nem folyik, de a B-limfocita gazdasejtben fokozódik a proliferáció és egyes citokinek, (pl. TNF-alfa, TGF-béta) termelődése [154]. Saját tanulmányunk is kimutatta az EBV fertőzés e stádiumának nagyarányú előfordulását a vizsgált periapikális léziókban. Ugyanakkor a periapikális léziókban előforduló EBV fertőzések mintegy harmadában nem volt detektálható az EBNA mRNS. A korábbi tanulmányokhoz [172, 173, 178, 179] képest az eredményeink abban jelentettek előrelépést, hogy kimutattuk a nagy lézióméret és a virális transzkripció együttes kockázati szerepét a panaszos megnyilvánulásban.

Humán herpesvírus (HHV)-6 orális jelenléte az EBV-hez hasonlóan jól ismert és az ínyszél felől kialakuló *parodontitis chronicában* többen is kimutatták [170, 175, 176]. Azonban *periodontitis apicalisban* munkacsoportunk írta le a két HHV-6 species jelenlétét. A HHV-6A főként panaszmentes és kisméretű léziókban fordult elő, míg a HHV-6B szignifikánsan halmozódott a nagyméretű panaszos periapikális léziókban. Ugyan a HHV-6 tendenciaszerűen az EBV-vel koinfekcióban fordult elő, mégis valószínű, hogy a HHV-6 vírusok halmozódása klinikai manifesztáció mentén az EBV hatástól függetlenül jelentkezett, mivel minden EBV/béta herpesvírus koinfekcióban ott volt az EBNA expresszió, de a nagyméretű panaszos lézióval csak a HHV-6B fertőzés asszociált, a többi béta herpesvírus nem. A HHV-6 fertőzések immunmoduláló hatása is ismert, a fertőzés fokozza a TNF-alfa, IL-1béta, IL-8 és IL-15 lokális termelődését [127, 129]. Az EBV és a HHV-6 fertőzések citokin hatásában közös mechanizmus a fokozott TNF-alfa termelődés, amelynek viszont jól ismert a lokális csontfelf szívódást és hiperalgéziát, panaszos manifesztációt okozó hatása [156].

Következtetések

Az endodonto-patógén baktériumok által kiváltott *periodontitis apicalis chronica* kórfolyamatban magas gyakorisággal előfordul az EBV vírus. Az EBV fertőzések mintegy kétharmadában megfigyelhető a transzformáló EBNA gének transzkripciós aktivitása, amely a lézió radiológiai méretével együtt a panaszos manifesztáció kockázati tényezője.

Kutatócsoportom írta le a HHV-6 vírusok előfordulását a periapikális léziókban, valamint a HHV-6B vírus halmozódását a nagyméretű, panaszos manifesztációjú periapikális léziókban.

Citokin mRNS expresszió periodontitis apicalisban

(Hernádi et al 2013 [315])

A *periodontitis apicalis* kórfolyamatát fokozott TNF-alfa és TGF-béta termelés jellemzi [317, 318]. A TNF-alfa egyrészt csontreszorpciót indukál az oszteoklasztok aktiválása révén [319], másrészt a nociceptív jelátvitel befolyásolásával hiperalgéziát okozhat [156]. A TGF-béta szerepe is többbétű, egyrészt a gyógyulást segíti elő a fibroblasztok proliferációja, a kötőszöveti állomány szintézise és az angiogenezis révén, másrészt negatív szabályzó szerepet tölt be a limfociták, elsősorban a citotoxikus T-sejtek gátlása révén ill. a toll-like receptorokhoz kapcsolódó jelátvitel gátlásával [320]. Ugyan *periodontitis apicalis*ban egyéb citokinek termelődése is megváltozik, a TNF-alfa és a TGF-béta citokinekkel azért foglalkoztunk kiemelten, mert termelődésüket az EBV és a HCMV fertőzés is képes fokozni [154]. A HHV-6 vírusok esetében a TNF-alfa termelés fokozódása volt ismert a vizsgálat tervezésekor [321]

Kutatási cél

TNF-alfa és TGF-béta mRNS expresszió vizsgálata periapikális léziókban

Prospektív, eset-kontroll klinikai vizsgálat. 58 prospektíven gyűjtött periapikális léziót dolgoztunk fel az előző fejezetben leírtak szerint. A periapikális léziókat a radiológiai méret alapján ≥ 5 mm és < 5 mm csoportokba osztályoztuk, a fogakat pedig panaszmentes és panaszos csoportokba. Akkor soroltuk az utóbbiba a fogat, ha az akután fáj, ráharapásra vagy kopogtatásra fájdalmat jelzett vagy a gyökércsúcs felőli nyálkahártya nyomásérzékeny volt. A feldolgozásig $< -70^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten fagyasztott mintákból DNS-t és RNS-t izoláltunk, a vírus genomi DNS-ét PCR amplifikálással mutattuk ki. Az izolált RNS-ből reverz transzkripciót követő Taqman génexpressziós ΔCt módszerrel határoztuk meg a TNF-alfa (ID: Hs00174128) és a TGF-béta (ID: Hs00998130) mRNS-ek GAPDH (ID: 0711024) endogén kontroll mRNS-re vonatkoztatott relatív expresszióját minden egyes periapikális mintában. Az egyes vizsgálati csoportokban a relatív citokin expresszió medián, kvartilis és szélső értékeit ábrázoltuk, a vizsgálati csoportokat a medián citokin expresszió alapján hasonlítottuk össze, két csoport közötti különbség szignifikanciáját non-parametrikus Mann-Whitney analízissel vizsgáltuk.

Eredmények

További mintagyűjtéssel 58-ra emelkedett a vizsgálandó periapikális minták száma, ami nem okozott lényeges változást (< 5 százalékpont) a korábban vizsgált herpesvírus fajok előfordulási arányában (20. táblázat), 5 és 10 százalékpont közötti változás csak a HHV-6B DNS prevalenciában és a panaszos léziók EBV prevalenciájában alakult ki. A mintaszám emelkedés megerősítette korábbi következtetéseinket az EBV és a HHV-6B vírusokról [313, 314].

20. táblázat Epstein-Barr vírus, humán cytomegalovírus, humán herpesvírus 6 és humán herpesvírus 8 DNS prevalenciája periapikális léziókban

	EBV	HCMV	HHV-6A	HHV-6B	HHV-8
periapikális lézió (n=58)	44*	7	4	9	0
panaszos (n=28)	25*	4	1	8⁺	0
panaszmentes (n=30)	19[#]	3	3	1	0
lézióméret ≥5mm (n=31)	29*	5	1	9⁺	0
lézióméret <5mm (n=27)	15[#]	2	3	0	0
kontroll minták (n=20)	2	0	0	0	0

*p<0,0001; #p<0,005 és +p<0,05 a kontrollokhoz viszonyítva

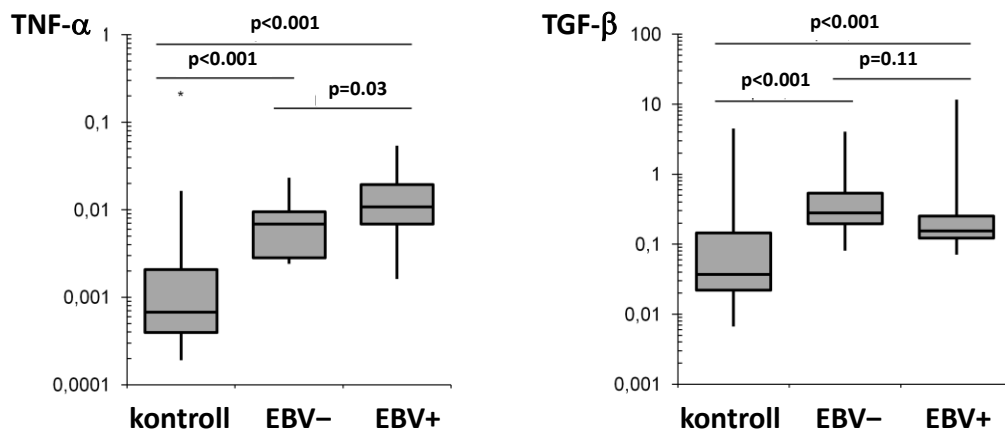
A Taqman génexpressziós vizsgálatok alapján a periapikális léziókban a TNF-alfa mRNS expresszió közelítőleg 13-szor, a TGF-béta mRNS expresszió közelítőleg ötször volt magasabb, mint a kontroll mintákban. Mindkét citokin expresszió emelkedése markánsan szignifikáns volt (21. táblázat). Ezen különbségek akkor is szignifikánsak maradtak, ha különböző klinikai paraméterek vagy különböző vírusok jelenléte alapján alcsoportokra bontottuk a periapikális léziókat.

A statisztikai összehasonlítást a különböző paraméterek szerint alábontott alcsoportpárok között is elvégeztük. Szignifikánsan magasabb TNF-alfa mRNS expresszió az EBV jelenlétéhez társult, az EBV pozitív léziókban a medián TNF-alfa expresszió több mint másfélszer magasabb volt, mint az EBV-negatív léziókban (21. táblázat). A relatív TNF-alfa expressziós értékek eloszlása az EBV-pozitív és EBV-negatív vizsgálati csoportokon belül a 16. ábrán látható. Sem a panaszos manifesztáció, sem a radiológiai méret nem befolyásolta a TNF-alfa expressziót. Az EBV-n túl a HCMV jelenlétében is magasabb volt a TNF-alfa expresszió, azonban az emelkedés nem volt szignifikáns szintű. A különböző klinikai paraméterek vagy különböző vírusok jelenléte alapján szembeállított alcsoportokban meglehetősen homogén eloszlást mutatott a TGF-béta expresszió. Legnagyobb különbség itt is az EBV-pozitív és az EBV negatív léziók alcsoportja között volt, az utóbbiban volt magasabb, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (21. táblázat).

21. táblázat
viszonyítva

TNF-alfa és TGF-béta mRNS expresszió periapikális léziókban a GAPDH endogén mRNS-hez

citokin	vizsgálati csoport	relatív expresszió (medián)	Mann-Whitney analízis	
			p érték az eset és a kontroll csoportok között	p érték az alcsoportok között
TNF-alfa	<i>kontroll</i>	6.8×10^{-4}	ref.	
	<i>periapikális lézió</i>	9×10^{-3}	<0.001	
	<u>alcsoportok:</u>			
	panaszmentes	9.3×10^{-3}	<0.001	0.59
	panaszos	8.2×10^{-3}	<0.001	
	<5mm	9.4×10^{-3}	<0.001	0.25
	≥5mm	8.7×10^{-3}	<0.001	
	EBV –	6.8×10^{-3}	<0.001	0.032
	EBV +	1.1×10^{-2}	<0.001	
	HCMV –	8.7×10^{-3}	<0.001	0.21
	HCMV +	1.5×10^{-2}	<0.001	
	HHV-6 –	9.2×10^{-3}	<0.001	0.75
	HHV-6 +	7×10^{-3}	<0.001	
TGF-béta	<i>kontroll</i>	3.7×10^{-2}	ref.	
	<i>periapikális lézió</i>	0.17	<0.001	
	<u>alcsoportok:</u>			
	panaszmentes	0.185	0.001	0.95
	panaszos	0.168	<0.001	
	<5mm	0.164	0.001	0.75
	≥5mm	0.174	<0.001	
	EBV –	0.28	<0.001	0.11
	EBV +	0.15	<0.001	
	HCMV –	0.176	<0.001	0.99
	HCMV +	0.173	0.017	
	HHV-6 –	0.173	<0.001	0.85
	HHV-6 +	0.205	0.003	



16. ábra Relatív TNF-alfa és TGF-béta mRNS expresszió (GAPDH endogén kontrollhoz viszonyítva, ΔC_t módszerrel számítva) kontroll mintákban, EBV-negatív és EBV-pozitív periapikális léziókban. A szürke oszlopok az alsó kvartilis, medián és felső kvartilis értékeket ábrázolják, míg a vonalak a teljes adattartományt.

Megbeszélés

A periapikális léziókban folyó fokozott TNF-alfa és TGF-béta termelődést a jelen vizsgálatban mRNS expressziós szinten erősítettük meg. A *periodontitis apicalis*ban elsődleges kóroki szerepet játszó Gram-negatív endodonto-patogén baktériumok kísérletesen körülmények között hatékonyan indukálják ezen citokinek termelődését [322]. Vizsgálatainkban az endodontális mikrobiota virális komponensének szerepét tanulmányoztuk a periapikális léziók klinikai paramétereivel együtt. A vizsgált tényezők közül az EBV jelenlétéhez az alapfolyamatén túl további szignifikáns TNF-alfa emelkedés társult. Bár az EBV jelenléte összefüggésben van a lézió méretével és a panaszos manifesztációjával [313], az utóbbi klinikai paraméterek nem befolyásolták a TNF-alfa expressziót, ami arra utal, hogy az EBV fertőzés közvetlenül hathat a TNF-alfa génexpresszióra. A HCMV és HHV-6 vírusok jelenlétében nem lehetett szignifikáns változást megfigyelni a TNF-alfa expresszióban. A HCMV pozitív léziókban a TNF-alfa mRNS expresszió medián értéke ugyan az EBV-hez hasonló emelkedést mutatott, de HCMV fertőzés szerepének megítélését legalább két tényező akadályozta: (i) tendenciaszerűen az EBV fertőzéssel együtt volt jelen, azaz a megfigyelt emelkedést akár az EBV komponens is okozhatta (ii) az alacsonyabb előfordulási arányból következő alacsony HCMV pozitív minta szám a statisztikai analízis erejét csökkentette.

Következtetés

A periapikális léziókban az alapfolyamatra jellemző fokozott citokin termelődésen túl, az EBV jelenlétéhez a TNF-alfa génexpresszió további emelkedése társul.

Morbillivírus kimutatása ankyloticus stapes talpmintákból

(Karosi et al 2004 [323], Karosi et al 2005 [324], Karosi et al 2005 [325])

A *stapes* fixáció (*stapes ankylosis*) kezelése műtéti úton *stapedectomiával* vagy *stapedotomiával* történik, az ovális ablak keretéről eltávolított *stapes* vagy *stapes* talpat művi implantátummal helyettesítik. A műtétek során eltávolított *stapes* talp alkalmas a humán és a mikrobiális nukleinsavak kimutatására. A *stapes* talp fejlődéstanilag eltér a temporális csonttól, többi hallócsonttól és a *stapes* szárától (*stapes* szuperstruktúra). Az *otosclerosis* kizárólag az *oticus capsula* területén fordul elő, amelyhez a *stapes* talp is tartozik [326].

Kutatási cél

Mikrobiális nukleinsav kimutatás és morfológiai analízis kidolgozása szklerotikus ill. kalcifikált mintákból [327, 328]

Morbillivírus RNS anatómiai lokalizációtól függő kimutatása. [323, 325]

Morbillivírus RNS előfordulása ankyloticus stapes talpminták szövettani eredménye szerint [324]

Betegcsoport. A vizsgálataink első szakaszában 34 műtéti úton eltávolított *stapes* talpmintát elemeztünk, a kontroll mintákat hat kortikális csont fragmentum és 3 *stapes* szuperstruktúra alkotta. A műtét előtt végzett audiometria a csontos és a légvezetés között legalább 30 dB különbséget mutatott. A fagyasztott mintákat steril körülmények között dörzscsészében porítottuk el és RNS-t izoláltunk belőlük [323].

A vizsgálatok második szakaszához a nukleinsav alapú és a morfológiai vizsgálatokra is alkalmas feldolgozás módszerét előrehaladott arterioszklerotikus *carotis* mintákon dolgoztuk ki. Cadaver eredetű *carotis communis-interna-externa* érszakaszokkal rendelkező izolált erek feltöltés után fagyasztva lettek 3 mm-es szakaszokra vágva és a vágási felületeken a digitális képfelvételeken a szklerotikus plakk, a lumen és az érfalvastagság alapján értékeltük a folyamat súlyosságát. A jellegzetes plakkot mutató vágási felszíntől elindulva 10 µm-s metszetek vágunk mikrotómmal fagyasztva metszés technikával, amelyekből az irodalmi adatokkal konzisztens módon (kb. 80 %-os arányban) kimutattuk *Chlamydomydia pneumoniae* jelenlétét kétlépcsős PCR amplifikációs eljárással [327, 328].

A vizsgálatok második szakaszában a szintén szklerotikus, kalcifikált *stapes* fixáció morfológiai és morbillivírus RNS vizsgálatára további 44 eltávolított *stapes* talpmintát dolgoztunk fel az alábbi módon: 10% formalin fixálás és 0,5M EDTA dekalifikálás után 15% zselatin blokkba ágyazott mintából 10 µm-es fagyasztott metszet sorozat készült a sorozat páratlan tagjai PCR amplifikálásra, a páros tagjai szövettani vizsgálatra kerültek, az értékelést KT és PM szerzőtársak végezték [324]. A

vizsgálatok harmadik szakaszában további 76 mintát gyűjtöttünk és az első szakaszhoz hasonlóan tártuk fel az RNS tartalmát [325].

Reverz transzkripció és cDNS amplifikálás. A homogenizált mintából szilikamembrános módszerrel izolált nukleinsav reverz transzkripcióját és PCR amplifikációját rTth polimerázzal végeztük. Az amplifikációhoz nukleokapszid specifikus primerekkel (MV2, MV3) a 1267 és 1609 nukleotid pozíciók között amplifikáltunk az első körben. A második PCR körben a MV3-MV4 seminested amplifikációban 231 bp terméket, ill. MV2-NP14 szintén seminested amplifikációban 221 bp terméket vártunk. Minden minta alkalmasságát endogén humán RNS amplifikálásával igazoltuk.

Eredmények

A vizsgálatok első szakaszában a 34 *stapes* talpmintából 20-ban (59%) mutattunk ki morbillivírus RNS-t. Tíz mintából mindkét (MV3-MV4, MV2-NP14) szekvencia amplifikálódott, míg hatból csak az MV3-MV4 szekvencia, négyből csak az MV2-NP14 szekvencia. Ebben a sorozatban kilenc olyan csontmintát vizsgáltunk, amely nem része az *oticus capsulának*, mind a három *stapes* szuperstruktúra és mind a hat kortikális csontfragmentum morbillivírus negatívnak bizonyult [323]. Ennek a vizsgálati szakasznak a tapasztalatai alapján a későbbi vizsgálati szakaszokban a műtéti eljárás adta lehetőségek figyelembe vételével a kontroll csontminták számát is sikerült jelentősen emelni. A műtétek közben eltávolított 64 kontroll minta egyikében sem lehetett morbillivírus RNS-t kimutatni, ahogyan a nem *otosclerosis*os két cadaver *stapes* talpból sem (23. táblázat). A kontroll minták között nagyobb arányban kortikális csontfragmentumok és *stapes* szuperstruktúra fordult elő, amelyekben a morbillivírus RNS teljes hiánya szignifikánsan ($p < 0,001$) eltért a 154 *stapes* talp 64%-os (99/154) morbillivírus RNS prevalenciájától [325].

22. táblázat Morbillivírus RNS előfordulása a *stapes* fixáció különböző szövettani formáiban

szövettani eredmény	morbillivírus RNS		
	MV3-MV4 + MV2-NP14	csak MV3-MV4	csak MV2-NP14
otosclerosis, aktív ($n=23$)	15	5	3
otosclerosis, inaktív ($n=9$)	5	1	3
anuláris kalcifikáció ($n=8$)	0	0	0
osteolysis, hemosziderofágos ($n=2$)	0	0	0
osteolysis, mononukleáris sejtes ($n=2$)	0	0	0

A vizsgálatok második szakaszában 44 *stapes* talpmintában összevetettük a morbillivírus RNS előfordulását a *stapes* fixáció háttérében álló szövettani folyamattal (22. táblázat). A mintáknak kb. a

fele az *otosclerosis* aktív, csontátépüléssel jellemezhető fázisában volt, míg az egyötöde az *otosclerosis* késői inaktív stádiumában volt, amelyben a szklerotikus kötőszöveti állományban gazdag, sejtszegény állomány dominál. A morbillivírus RNS előfordulás igen fajlagos módon, 100%-ban kötődött az *otosclerosis*hoz, míg az egyéb *stapes* fixációkban nem lehetett kimutatni.

Megbeszélés

A feltárás, a sejtszegénység és a kis mintatérfogat miatt igen kritikus mintatípusban mutattunk ki perzisztáló virális RNS-t. A perzisztens fertőzésekben eleve kis kópiaszámot vártunk, ezért érzékeny kétlépcsős amplifikálással mutattuk ki az RNS-ről átírt cDNS-t. A belső körös amplifikációnál mindkét primerpár jelet adott a pozitív minták 58 %-ában, míg a csak az egyik ill. csak a másik primerpár a 23 ill. 19 %-ában mutatta ki virális RNS-t. Ezen eredmények összhangban vannak a morbillivírus pontatlan replikációjával, magas mutációs rátájával és a defektív virális termékek magas arányával perzisztens fertőzésekben [182]. Ezért a további vizsgálatainkban [324, 325] is mindkét primer párt alkalmaztuk és bármelyik pozitivitása a vírus jelenlétére utalt.

Az első vizsgálati sorozatunkban olyan mintákat dolgoztunk fel, amelyek kivizsgálásánál *stapes* fixációt valószínűsítettek ill. a műtét során igazoltak. A *stapes* fixáció háttérében a klinikai adatok alapján *otosclerosis*ist lehetett feltételezni ill. *stapes* fixációt okozó folyamatok ismeretében a minták többségében valóban *otosclerosis*nak kellett lenni, bár ebben a vizsgálati sorozatban azt nem lehetett megmondani, hogy pontosan melyik mintában volt *otosclerosis*. Ebből a vizsgálati sorozatból hazai vonatkozásban úttörő, nemzetközi vonatkozásban szintén élenjáró eredményeket jelentett az, hogy a virális RNS-t közvetlenül a csontot érintő gócból lehetett kimutatni a *stapes* fixációs esetek nagyobb felében és nem lehetett kimutatni a középfül egyéb csontos elemeiből. Az első vizsgálati szakasz eredményei alapján a további tanulmányokban részben az *otosclerosis* definitív diagnózisát biztosító szövettani vizsgálatot végeztünk [324], részben a műtéti körülményektől függően a középfül megfelelő csontos elemeit kontroll minta minőségben begyűjtöttük [325]. A kontroll csontminták számának növelése igazolta, hogy a középfül egyéb csontos elemeiben (42 kortikális csont, 19 *stapes* szuperstruktúra, 3 egyéb hallócsont) valóban nem fordul elő morbillivírus RNS, hiába alakult ki a *stapes ankylosis*, azaz a virális RNS előfordulása az *ankylosis* által érintett területre korlátozódott.

A vizsgálatok második szakaszában a definitív szövettani eredménnyel vetettük össze a morbillivírus előfordulását. Mind aktív, mind késői inaktív stádiumú *otosclerosis*ban minden esetben kimutattuk a virális RNS-t, míg az egyéb *stapes ankylosis*os esetek közül egyben sem. A vizsgálataink során morbillivírus negatív, de szövettanilag nem vizsgált, *stapes* talpmintákban feltehetően nem *otosclerosis* okozta a *stapes ankylosis*ist, hanem genetikai okok ill. degeneratív folyamatok lehettek a háttérben [193, 329]. Az *otosclerosis*ban a morbillivírus jelenlétén túl a vírusfertőzés gazdaszervezetre kifejtett hatásai is kimutathatók és a vírus patogén szerepének plauzibilitását erősítik. Idetartozó megfigyelések: a vírus perzisztálása az ellenanyag válaszkészség hiányával párosul [330] ill. az

otosclerosis góciókban a vírus receptorának a CD46-nak sajátos, *otosclerosis*-ra jellemző mRNS érési formái jelennek meg [331].

Következtetés

Az morbillivírus RNS jelenléte specifikusan társul az *otosclerosis* által okozott *stapes* fixációhoz és csak a megbetegedést okozó gócióban fordul elő, a környező, eltérő fejlődéstani eredetű csontokban nem.

TNF-alfa mRNS expresszió és a morbillivírus stapes ankylosisban

(Karosi et al 2005 [325])

Az *otosclerosis* aktív gócaiban oszteoklaszt, fibroblaszt és proliferáló endotél sejtek dominálnak [194]. A csontreszorpciós góciókban a fokozott oszteoklaszt aktivitás mutatható ki [332]. A góciók szélein CD19+ B-limfociták és CD8+ T-limfociták akkumulálódnak [199, 332], de a kísérleti tervezés idején még nem volt ismert citokin szekréciójuk a gyulladásos góciókban. A TNF-alfa központi szerepet játszik az oszteoklaszt sejtek aktivációjában és az *osteolysis*-ben [333]. A perzisztens morbillivírus fertőzésekkel szemben lokálisan kialakuló gyulladásos folyamatok plauzibilis kapcsolatot jelentenek a vírus és az *otosclerosis* között. A *stapes* szuperstruktúrában, amelyet eredményeink alapján sem a morbillivírus, sem az *ankylosis* nem érint, a proinflammatorikus TNF-alfa sem expresszáldott. (23. táblázat).

Kutatási cél

TNF-alfa mRNS expresszió és a morbillivírus RNS előfordulása stapes ankylosisban [325]

Betegcsoport. Az előző alfejezetben részletezett mintagyűjtésből származó összesen 154 műtéti úton eltávolított *stapes* talpmintában TNF-alfa expressziót összevetettük a morbillivírus RNS jelenlétével. A TNF-alfa mRNS expressziót kétlépcsős seminested PCR módszerrel mutattuk ki cDNS mintákból.

Eredmények

A előző fejezetben kifejtett módon, a szakirodalomban jelentékeny méretű tanulmányban mutattuk be a morbillivírus RNS előfordulását az *ankylosis stapes* talpmintákban. A morbillivírus pozitív *stapes* fixációs esetek 89 %-ában kimutatható volt a TNF-alfa mRNS expresszió, míg a morbillivírus negatív eseteknek csak 11 %-ában, ami szignifikáns különbségnek ($p < 0,01$) bizonyult. A kontroll minták közül a folyamat közvetlen környezetében lévő *stapes* szuperstruktúrákban nem volt kimutatható TNF-alfa mRNS expresszió.

23. táblázat TNF-alfa mRNS expresszió és morbillivírus RNS előfordulásához *stapes* fixációban

	stapes ankylosis (n=154)		kontroll minták (n=66)				
	MV [#] poz (n=99)	MV [#] neg (n=55)	kortikális csont (n=42)	stapes szuperstr* (n=19)	incus (n=2)	malleus (n=1)	cadaver stapes (n=2)
morbilli RNS							
MV3-MV4 + MV2-NP14	63	0	0	0	0	0	0
csak MV3-MV4	20	0	0	0	0	0	0
csak MV2-NP14	16	0	0	0	0	0	0
endogén mRNS**	99	55	42	19	2	1	2
TNF-alfa mRNS	88	6	nv	0	nv	nv	0

**stapes* szuperstruktúra **humán endogén mRNS kontroll, [#]MV: morbillivírus

A morbillivírus pozitív *stapes ankylosis* esetek preoperatív audiometriai eredményeit összevetettük a TNF-alfa mRNS expresszióval. Az audiometriával meghatározott csontlégköz érték alacsony frekvencián (0,25-0,5 kHz) szignifikánsan alacsonyabb volt a TNF-alfa mRNS expressziót mutató esetekben, mint a TNF-alfa negatív csoportban (30 ± 10 dB vs. 50 ± 12 dB, $p < 0,001$). A halláscsökkenés panaszok a TNF-alfa mRNS pozitív esetekben a műtét előtt $4,1 \pm 1,8$ évvel jelentkeztek először, szemben a TNF-alfa negatív csoporttal, ahol a műtét előtt $9,6 \pm 3,54$ tartamban állt fenn a halláscsökkenés. Az említett klinikai adatok arra utalnak, hogy a TNF-alfa pozitív csoport az otosclerosis aktív korai stádiumában, míg a TNF-alfa negatív csoport az előrehaladott késői stádiumában volt.

Megbeszélés

A perzisztens morbillivírus fertőzés tartós antigénstimulussal és a gyulladás tartós fenntartásával járhat. Az előző fejezetben tárgyaltak alapján a morbillivírus pozitív esetek mögött otosclerosis, míg a morbillivírus negatív mögött egyéb *stapes* fixáció (genetikus, disztrófiás meszesedés, egyéb gyulladásos eredetű) lehetett. A morbillivírus pozitív esetekben jellemzően fennálló TNF-alfa expresszió összhangban van az aktív reszorpciós göcöket tartalmazó *otosclerosis* *stapes* fixáció patomechanizmusával. A morbillivírus pozitív TNF-alfa negatív esetekben az otosclerosis valószínűleg már előrehaladott, inaktív stádiumban volt. A morbillivírus negatív *stapes* fixációs esetek heterogenitását a TNF-alfa expresszió is alátámasztja, gyulladással járó patomechanizmus csak az esetek töredékében volt jelen. A TNF-alfa az oszteoklaszt és oszteoblaszt működés közötti egyensúlyra hat [319]. A TNF-alfának az oszteoklaszt aktiváló és csontreszorpciót fokozó hatását

ellensúlyozza az oszteoprotegerin [334] Az *otosclerosis* csontátépülésben a TNF-alfa és oszteoprotegerin szerepét az is alátámasztja, hogy az *otosclerosis* folyamat előrehaladtával szűnik a TNF-alfa expresszió és megjelenik az antagonista hatású oszteoprotegerin, amely mind mRNS [335], mind fehérje szinten kimutatható [336].

Következtetés

A TNF-alfa mechanizmus aktiválódása jellemzően a *stapes ankylosis* morbillivírus pozitív, *otosclerosis* formájának aktív stádiumában jelenik meg.

Összefoglalás és új eredmények

Munkám során perzisztens fertőzések patogenetikai szerepét vizsgáltam három klinikai témában. A humán papillomavírusok szerepét a cervikális karcinogenezisben, a herpesvírusok szerepét a *periodontitis apicalis chronicában*, a morbillivírus szerepét az *otosclerosisban* molekuláris epidemiológiai módszerekkel, klinikai tanulmányokkal közelítettem meg. A vizsgált tárgyat képező perzisztensen fertőző mikroorganizmusokat érzékeny nukleinsav alapú vizsgálati módszerekkel lehetett detektálni. A jellemzően inhomogén klinikai mintákból megoldottuk a kórokozó és a gazdasejt eredetű nukleinsavak megfelelő feltárását és nukleinsav amplifikációs detektálását. A mikroorganizmusokra specifikus nukleinsav szekvenciák betegség specifikus halmozódását mindhárom klinikai területen szignifikáns mértékben mutatta ki kutatócsoportom. Mindhárom klinikai területen igazoltuk, hogy mikroorganizmus jelenlétéhez olyan patomechanizmusok társulnak, amelyek hozzájárulnak a vizsgált megbetegedés fenntartásához, progressziójához. A humán papillomavírusok patogenetikai szerepének vizsgálatában a molekuláris feltételrendszer időbeli és reverzibilitási pontjait is vizsgáltuk, amelynek eredményei konzisztensen illeszkedtek a betegség specifikus halmozódásra vonatkozó eredményekhez. A humán papillomavírusok kórokozó képességének molekuláris mechanizmusait *in vitro* kísérletes rendszerekben vizsgáltam. A vizsgált perzisztens fertőzések kórfolyamatainak megismerésében az alábbi új eredmények születtek:

Humán papillomavírusok patogenetikai szerepe

- A nukleinsav hibridizáción alapuló Hybrid Capture HPV® rendszer hatékonyan kiegészíthető PCR amplifikáción és restrikciós enzimhasításon alapuló tipizálással. A hibridizációs körülmények a tesztben validált HPV típusokon túl további HPV típusok kimutatására is alkalmasak. Az ebből adódó típusbővülés elhanyagolható mértékben érinti az onkogén és nem onkogén HPV típusok elkülönítését és nem befolyásolja az eredmények klinikai interpretációját.
- Kutatócsoportom írta le, hogy az elsődleges vakcina típusok (HPV-16, HPV-18) onkológiai kockázata háromszorosan meghaladja az egyéb onkogén típusokét. Kóros citológiai elváltozás mellett az elsődleges vakcinatípusok háromszor nagyobb onkológiai kockázata legalább 30 hónapos időtávon fennáll.
- Az onkogén HPV csoporton belüli háromszoros különbség több mint hússzor alacsonyabb, mint az a kockázat, amelyet a csoport egésze jelent. A méhnyakszűrés hatékonyságát jelentős mértékben növeli az onkogén HPV csoport szintjén informatív diagnosztika, amelyhez képest a csoporton belüli további tipizálás szekunder prevenciós értéke elhanyagolható.

Eredményeim igazolták a papillomavírus kimutatás kiváló negatív prediktív értékét mind citológiai atípiában, mind a rákmegelőző elváltozások műtéti eltávolítása után. A gazdaszervezeti tényezők közül a kiviselt terhességek kockázati tényező szerepét igazoltuk

- Az IL-10 promoterben nt-1082(rs1800896) G allélt hordozó nők kevésbé fogékonyak a HPV fertőzéstől független citológiai atípiára, mint az AA homozigóták. Ugyanakkor a HPV által indukált citológiai eltérésekre nem hatott az IL-10 promoter nt-1082 polimorfizmusa.
- Az IL-10 gén proximális promoter szakaszán konzisztens CpG metilációs mintázat figyelhető meg cervix carcinoma eredetű sejtvonalakban, valamint exfoliált hámsejtekben és cervix carcinoma biopsziákban. A metilációs mintázat legspecifikusabb eleme a legproximálisabb $_{110}$ CpG, amelynek metilációs állapota korrelált a legkövetkezetesebben az IL-10 expresszió hiányával. Mind a fiziológiás, mind a neoplastikus epiteliális sejtekben az IL-10 promoter CpG metilációja együtt jár a deacetilált hiszton (H3 és H4) struktúrával. Az IL-10 gén epigenetikus inaktivált állapotát nem befolyásolja a HPV genom jelenléte vagy hiánya.
- A proliferálódó keratinocitákban a non-receptor Src tirozinkinázok közül a Fyn konstitutív módon jelen van, míg az Src és Yes szintje HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek együttes jelenlétében növekszik meg. Az E7 onkoprotein további hatása, hogy tirozin foszforilációs mechanizmussal fokozza a jelenlévő Src kinázok aktivitását.

Humán herpesvírusok patogenetikai szerepe

- Az endodonto-patogén baktériumok által kiváltott *periodontitis apicalis chronica* kórfolyamatban magas gyakorisággal előfordul az EBV vírus. Az EBV fertőzések mintegy kétharmadában megfigyelhető a transzformáló EBNA gének transzkripció aktivitása, amely a lézió radiológiai méretével együtt a panaszos manifesztáció kockázati tényezője.
- Kutatócsoportom írta le a HHV-6 vírusok előfordulását a periapikális léziókban, valamint a HHV-6B vírus halmozódását a nagyméretű, panaszos manifesztációjú periapikális léziókban.
- A periapikális léziókban az alapfolyamatra jellemző fokozott citokin termelődésen túl, az EBV jelenlétéhez a TNF-alfa génexpresszió további emelkedése társul.

Morbillivírus patogenetikai szerepe

- Az morbillivírus RNS jelenléte specifikusan társul az *otosclerosis* által okozott *stapes* fixációhoz és csak a megbetegedést okozó gócban fordul elő, a környező, eltérő fejlődéstani eredetű csontokban nem.
- A TNF-alfa mechanizmus aktiválódása jellemzően a *stapes ankylosis* morbillivírus pozitív, *otosclerosis* formájának aktív stádiumában jelenik meg.

Irodalomjegyzék

1. *Pathogenesis of Bacterial Infection*, in Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, J.S.B. G.F.Brooks, and S.A.Morse, Editor. 2004, McGraw-Hill Companies. p. 147-160.
2. Vargáné Hajdú, P. and Boján, F., *Következtetések és oksági összefüggések az epidemiológiában*, in *Demográfiai és epidemiológiai módszerek a népegészségügyben*, P. Vargáné Hajdú and F. Boján, Editors. 1996, Literatura Medica Kiadó: Budapest. p. 169-175.
3. Gissmann, L. and zur Hausen, H., *Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata)*. Int J Cancer, 1980. **25**(5): p. 605-9.
4. Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S., and Rowekamp, W.G., *Human papillomavirus type 16 DNA sequence*. Virology, 1985. **145**(1): p. 181-5.
5. Manos, M.M., Waldman, J., Zhang, T.Y., Greer, C.E., Eichinger, G., Schiffman, M.H., and Wheeler, C.M., *Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses*. J Infect Dis, 1994. **170**(5): p. 1096-9.
6. Lowy, D.R. and Howley, P.M., *Papillomaviruses*, in *Fields: Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2231-64.
7. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.
8. Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., and Wacholder, S., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
9. Christensen, N.D., Dillner, J., Eklund, C., Carter, J.J., Wipf, G.C., Reed, C.A., Cladel, N.M., and Galloway, D.A., *Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies*. Virology, 1996. **223**(1): p. 174-84.
10. Christensen, N.D., Kirnbauer, R., Schiller, J.T., Ghim, S.J., Schlegel, R., Jenson, A.B., and Kreider, J.W., *Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes*. Virology, 1994. **205**(1): p. 329-35.
11. Christensen, N.D., Reed, C.A., Cladel, N.M., Hall, K., and Leiserowitz, G.S., *Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6*. Virology, 1996. **224**(2): p. 477-86.
12. Silins, I., Wang, Z., Avall-Lundqvist, E., Frankendal, B., Vikmanis, U., Sapp, M., Schiller, J.T., and Dillner, J., *Serological evidence for protection by human papillomavirus (HPV) type 6 infection against HPV type 16 cervical carcinogenesis*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 11): p. 2931-6.
13. Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., and de Villiers, E.M., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
14. Kirnbauer, R., Hubbert, N.L., Wheeler, C.M., Becker, T.M., Lowy, D.R., and Schiller, J.T., *A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(7): p. 494-9.
15. Wang, Z., Christensen, N., Schiller, J.T., and Dillner, J., *A monoclonal antibody against intact human papillomavirus type 16 capsids blocks the serological reactivity of most human sera*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 9): p. 2209-15.
16. Maes, P. http://pave.niaid.nih.gov/#analyze/l1_taxonomy_tool. [cited 2015 22/12/2015].
17. Day, P.M., Pang, Y.Y., Kines, R.C., Thompson, C.D., Lowy, D.R., and Schiller, J.T., *A human papillomavirus (HPV) in vitro neutralization assay that recapitulates the in vitro process of infection provides a sensitive measure of HPV L2 infection-inhibiting antibodies*. Clin Vaccine Immunol, 2012. **19**(7): p. 1075-82.

18. Kines, R.C., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M., *The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20458-63.
19. Ishii, Y., Nakahara, T., Kataoka, M., Kusumoto-Matsuo, R., Mori, S., Takeuchi, T., and Kukimoto, I., *Identification of TRAPPC8 as a host factor required for human papillomavirus cell entry*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80297.
20. Johnson, K.M., Kines, R.C., Roberts, J.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M., *Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2067-74.
21. Lipovsky, A., Popa, A., Pimienta, G., Wyler, M., Bhan, A., Kuruvilla, L., Guie, M.A., Poffenberger, A.C., Nelson, C.D., Atwood, W.J., and DiMaio, D., *Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. 7452-7.
22. Woodham, A.W., Da Silva, D.M., Skeate, J.G., Raff, A.B., Ambroso, M.R., Brand, H.E., Isas, J.M., Langen, R., and Kast, W.M., *The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43519.
23. Graham, B.S., Kines, R.C., Corbett, K.S., Nicewonger, J., Johnson, T.R., Chen, M., LaVigne, D., Roberts, J.N., Cuburu, N., Schiller, J.T., and Buck, C.B., *Mucosal delivery of human papillomavirus pseudovirus-encapsidated plasmids improves the potency of DNA vaccination*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(5): p. 475-86.
24. Pastrana, D.V., Buck, C.B., Pang, Y.Y., Thompson, C.D., Castle, P.E., FitzGerald, P.C., Kruger Kjaer, S., Lowy, D.R., and Schiller, J.T., *Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18*. Virology, 2004. **321**(2): p. 205-16.
25. Selinka, H.C., Giroglou, T., and Sapp, M., *Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions*. Virology, 2002. **299**(2): p. 279-287.
26. Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., and Sakai, H., *Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 152.
27. Pyeon, D., Pearce, S.M., Lank, S.M., Ahlquist, P., and Lambert, P.F., *Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000318.
28. Chow, L.T., Duffy, A.A., Wang, H.K., and Broker, T.R., *A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus: Elucidation of natural virus-host interactions*. Cell Cycle, 2009. **8**(9): p. 1319-23.
29. Barbaresi, S., Cortese, M.S., Quinn, J., Ashrafi, G.H., Graham, S.V., and Campo, M.S., *Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 2): p. 521-30.
30. Bodily, J.M., Mehta, K.P., Cruz, L., Meyers, C., and Laimins, L.A., *The E7 open reading frame acts in cis and in trans to mediate differentiation-dependent activities in the human papillomavirus type 16 life cycle*. J Virol, 2011. **85**(17): p. 8852-62.
31. Ganguly, N. and Parihar, S.P., *Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis*. J Biosci, 2009. **34**(1): p. 113-23.
32. Moody, C.A. and Laimins, L.A., *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-60.
33. Mantovani, F. and Banks, L., *The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression*. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7874-87.
34. Kumar, A., Zhao, Y., Meng, G., Zeng, M., Srinivasan, S., Delmolino, L.M., Gao, Q., Dimri, G., Weber, G.F., Wazer, D.E., Band, H., and Band, V., *Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 5801-12.
35. Munger, K. and Howley, P.M., *Human papillomavirus immortalization and transformation functions*. Virus Res, 2002. **89**(2): p. 213-28.

36. Cho, N.H., Kim, Y.T., and Kim, J.W., *Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors*. Yonsei Med J, 2002. **43**(6): p. 722-8.
37. Kalantari, M., Karlsen, F., Kristensen, G., Holm, R., Hagmar, B., and Johansson, B., *Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis*. Int J Gynecol Pathol, 1998. **17**(2): p. 146-53.
38. Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Durst, M., Schneider, A., and von Knebel Doeberitz, M., *Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions*. Cancer Res, 2008. **68**(1): p. 307-13.
39. Veress, G., Szarka, K., Dong, X.P., Gergely, L., and Pfister, H., *Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 4): p. 1035-43.
40. Roskoski, R., Jr., *Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(1): p. 1-14.
41. Sen, B. and Johnson, F.M., *Regulation of SRC family kinases in human cancers*. J Signal Transduct, 2011. **2011**: p. 865819.
42. Kong, L., Deng, Z., Shen, H., and Zhang, Y., *Src family kinase inhibitor PP2 efficiently inhibits cervical cancer cell proliferation through down-regulating phospho-Src-Y416 and phospho-EGFR-Y1173*. Mol Cell Biochem, 2011. **348**(1-2): p. 11-9.
43. Nam, J.S., Ino, Y., Sakamoto, M., and Hirohashi, S., *Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2430-6.
44. Guarino, M., *Src signaling in cancer invasion*. J Cell Physiol, 2010. **223**(1): p. 14-26.
45. Leto, M., Santos Junior, G.F., Porro, A.M., and Tomimori, J., *Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations*. An Bras Dermatol, 2011. **86**(2): p. 306-17.
46. Hazard, K., Karlsson, A., Andersson, K., Ekberg, H., Dillner, J., and Forslund, O., *Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(1): p. 116-9.
47. Forslund, O., Lindelof, B., Hradil, E., Nordin, P., Stenquist, B., Kirnbauer, R., Slupetzky, K., and Dillner, J., *High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in "Stripped" biopsies from the same tumors*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(2): p. 388-94.
48. Poljak, M., *Review of 20 years of HPV research in Slovenia*. Acta Dermatovenereol Alp Pannonica Adriat, 2011. **20**(3): p. 99-112.
49. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., and Munoz, N., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
50. Szarka, K., Veress, G., Juhasz, A., Konya, J., Sapy, T., Soos, G., Hernadi, Z., and Gergely, L., *Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers*. Anticancer Res, 2000. **20**(3B): p. 2161-7.
51. Jenson, A.B. and Lancaster, W.D., *Association of human papillomavirus with benign, premalignant and malignant anogenital lesions.*, in *Papillomaviruses and human cancer*, H. Pfister, Editor. 1990, CRC Press: Boca Raton. p. 11-44.
52. Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., Jr., and Young, N., *The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology*. JAMA, 2002. **287**(16): p. 2114-9.
53. Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., and Meijer, C.J., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
54. Halc, G., Alemany, L., Lloveras, B., Schmitt, M., Alejo, M., Bosch, F.X., Tous, S., Klaustermeier, J.E., Guimera, N., Grabe, N., Lahrmann, B., Gissmann, L., Quint, W., de

- Sanjose, S., and Pawlita, M., *Pathogenic role of the eight probably/possibly carcinogenic HPV types 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 and 82 in cervical cancer*. J Pathol, 2014. **234**(4): p. 441-51.
55. Beaudenon, S., Praetorius, F., Kremsdorf, D., Lutzner, M., Worsaae, N., Pehau-Arnaudet, G., and Orth, G., *A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia*. J Invest Dermatol, 1987. **88**(2): p. 130-5.
 56. Szarka, K., Tar, I., Feher, E., Gall, T., Kis, A., Toth, E.D., Boda, R., Marton, I., and Gergely, L., *Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(4): p. 314-8.
 57. Coleman, N., Birley, H.D., Renton, A.M., Hanna, N.F., Ryait, B.K., Byrne, M., Taylor-Robinson, D., and Stanley, M.A., *Immunological events in regressing genital warts*. Am J Clin Pathol, 1994. **102**(6): p. 768-74.
 58. Suzich, J.A., Ghim, S.J., Palmer-Hill, F.J., White, W.I., Tamura, J.K., Bell, J.A., Newsome, J.A., Jenson, A.B., and Schlegel, R., *Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11553-7.
 59. Strickler, H.D., Dillner, J., Schiffman, M.H., Eklund, C., Glass, A.G., Greer, C., Scott, D.R., Sherman, M.E., Kurman, R.J., and Manos, M., *A seroepidemiologic study of HPV infection and incident cervical squamous intraepithelial lesions*. Viral Immunol, 1994. **7**(4): p. 169-77.
 60. Evander, M., Edlund, K., Gustafsson, A., Jonsson, M., Karlsson, R., Rylander, E., and Wadell, G., *Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study*. J Infect Dis, 1995. **171**(4): p. 1026-30.
 61. Hildesheim, A., Schiffman, M.H., Gravitt, P.E., Glass, A.G., Greer, C.E., Zhang, T., Scott, D.R., Rush, B.B., Lawler, P., Sherman, M.E., and et al., *Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women*. J Infect Dis, 1994. **169**(2): p. 235-40.
 62. Petry, K.U., Scheffel, D., Bode, U., Gabrysiak, T., Kochel, H., Kupsch, E., Glaubitz, M., Niesert, S., Kuhnle, H., and Schedel, I., *Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions*. Int J Cancer, 1994. **57**(6): p. 836-40.
 63. Keating, P.J., Cromme, F.V., Duggan-Keen, M., Snijders, P.J., Walboomers, J.M., Hunter, R.D., Dyer, P.A., and Stern, P.L., *Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression*. Br J Cancer, 1995. **72**(2): p. 405-11.
 64. Stellato, G., Nieminen, P., Aho, M., Lehtinen, T., Lehtinen, M., and Paavonen, J., *Type 1 cytokine response and treatment outcome of genital HPV lesions*. Genitourin Med, 1997. **73**(5): p. 387-90.
 65. Clerici, M., Merola, M., Ferrario, E., Trabattoni, D., Villa, M.L., Stefanon, B., Venzon, D.J., Shearer, G.M., De Palo, G., and Clerici, E., *Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(3): p. 245-50.
 66. Giannini, S.L., Al-Saleh, W., Piron, H., Jacobs, N., Doyen, J., Boniver, J., and Delvenne, P., *Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 183-9.
 67. Al-Harthi, L., Wright, D.J., Anderson, D., Cohen, M., Matityahu, D., Cohn, J., Cu-Unvin, S., Burns, D., Reichelderfer, P., Lewis, S., Beckner, S., Kovacs, A., and Landay, A., *The impact of the ovulatory cycle on cytokine production: evaluation of systemic, cervicovaginal, and salivary compartments*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(8): p. 719-24.
 68. Crowley-Nowick, P.A., Ellenberg, J.H., Vermund, S.H., Douglas, S.D., Holland, C.A., and Moscicki, A.B., *Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens*. J Infect Dis, 2000. **181**(3): p. 939-45.
 69. Gravitt, P.E., Hildesheim, A., Herrero, R., Schiffman, M., Sherman, M.E., Bratti, M.C., Rodriguez, A.C., Morera, L.A., Cardenas, F., Bowman, F.P., Shah, K.V., and Crowley-Nowick,

- P.A., *Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in cervical secretions*. J Clin Immunol, 2003. **23**(3): p. 175-83.
70. El-Sherif, A.M., Seth, R., Tighe, P.J., and Jenkins, D., *Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer*. J Pathol, 2001. **195**(2): p. 179-85.
 71. Kawamura, T. and Furue, M., *Comparative analysis of B7-1 and B7-2 expression in Langerhans cells: differential regulation by T helper type 1 and T helper type 2 cytokines*. Eur J Immunol, 1995. **25**(7): p. 1913-7.
 72. Levi, F., Lucchini, F., Negri, E., Franceschi, S., and la Vecchia, C., *Cervical cancer mortality in young women in Europe: patterns and trends*. Eur J Cancer, 2000. **36**(17): p. 2266-71.
 73. Berkhof, J., Coupe, V.M., Bogaards, J.A., van Kemenade, F.J., Helmerhorst, T.J., Snijders, P.J., and Meijer, C.J., *The health and economic effects of HPV DNA screening in The Netherlands*. Int J Cancer, 2010. **127**(9): p. 2147-58.
 74. Bistoletti, P., Sennfalt, K., and Dillner, J., *Cost-effectiveness of primary cytology and HPV DNA cervical screening*. Int J Cancer, 2008. **122**(2): p. 372-6.
 75. Dillner, J., Rebolj, M., Birembaut, P., Petry, K.U., Szarewski, A., Munk, C., de Sanjose, S., Naucier, P., Lloveras, B., Kjaer, S., Cuzick, J., van Ballegooijen, M., Clavel, C., and Iftner, T., *Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study*. BMJ, 2008. **337**: p. a1754.
 76. Petry, K.U., Luyten, A., and Scherbring, S., *Accuracy of colposcopy management to detect CIN3 and invasive cancer in women with abnormal screening tests: results from a primary HPV screening project from 2006 to 2011 in Wolfsburg, Germany*. Gynecol Oncol, 2013. **128**(2): p. 282-7.
 77. Wright, T.C., Stoler, M.H., Behrens, C.M., Sharma, A., Zhang, G., and Wright, T.L., *Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test*. Gynecol Oncol, 2015. **136**(2): p. 189-97.
 78. Huh, W.K., Ault, K.A., Chelmow, D., Davey, D.D., Goulart, R.A., Garcia, F.A., Kinney, W.K., Massad, L.S., Mayeaux, E.J., Saslow, D., Schiffman, M., Wentzensen, N., Lawson, H.W., and Einstein, M.H., *Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance*. Gynecol Oncol, 2015. **136**(2): p. 178-82.
 79. Heino, P., Skyldberg, B., Lehtinen, M., Rantala, I., Hagmar, B., Kreider, J.W., Kirnbauer, R., and Dillner, J., *Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 5): p. 1141-53.
 80. Villa, L.L., Costa, R.L., Petta, C.A., Andrade, R.P., Paavonen, J., Iversen, O.E., Olsson, S.E., Hoyer, J., Steinwall, M., Riis-Johannessen, G., Andersson-Ellstrom, A., Elfgrén, K., Krogh, G., Lehtinen, M., Malm, C., Tamms, G.M., Giacoletti, K., Lupinacci, L., Railkar, R., Taddeo, F.J., Bryan, J., Esser, M.T., Sings, H.L., Saah, A.J., and Barr, E., *High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up*. Br J Cancer, 2006. **95**(11): p. 1459-66.
 81. Kahn, J.A., *HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia*. N Engl J Med, 2009. **361**(3): p. 271-8.
 82. Harper, D.M., Franco, E.L., Wheeler, C.M., Moscicki, A.B., Romanowski, B., Roteli-Martins, C.M., Jenkins, D., Schuind, A., Costa Clemens, S.A., and Dubin, G., *Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial*. Lancet, 2006. **367**(9518): p. 1247-55.
 83. Paavonen, J., Naud, P., Salmeron, J., Wheeler, C.M., Chow, S.N., Apter, D., Kitchener, H., Castellsague, X., Teixeira, J.C., Skinner, S.R., Hedrick, J., Jaisamrarn, U., Limson, G., Garland, S., Szarewski, A., Romanowski, B., Aoki, F.Y., Schwarz, T.F., Poppe, W.A., Bosch, F.X., Jenkins, D., Hardt, K., Zahaf, T., Descamps, D., Struyf, F., Lehtinen, M., and Dubin, G., *Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women*. Lancet, 2009. **374**(9686): p. 301-14.

84. Olsson, S.E., Kjaer, S.K., Sigurdsson, K., Iversen, O.E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C.M., Perez, G., Brown, D.R., Koutsky, L.A., Tay, E.H., Garcia, P., Ault, K.A., Garland, S.M., Leodolter, S., Tang, G.W., Ferris, D.G., Paavonen, J., Lehtinen, M., Steben, M., Bosch, F.X., Dillner, J., Joura, E.A., Majewski, S., Munoz, N., Myers, E.R., Villa, L.L., Taddeo, F.J., Roberts, C., Tadesse, A., Bryan, J., Maansson, R., Vuocolo, S., Hesley, T.M., Saah, A., Barr, E., and Haupt, R.M., *Evaluation of quadrivalent HPV 6/11/16/18 vaccine efficacy against cervical and anogenital disease in subjects with serological evidence of prior vaccine type HPV infection*. Hum Vaccin, 2009. **5**(10): p. 696-704.
85. Lehtinen, M., Paavonen, J., Wheeler, C.M., Jaisamrarn, U., Garland, S.M., Castellsague, X., Skinner, S.R., Apter, D., Naud, P., Salmeron, J., Chow, S.N., Kitchener, H., Teixeira, J.C., Hedrick, J., Limson, G., Szarewski, A., Romanowski, B., Aoki, F.Y., Schwarz, T.F., Poppe, W.A., De Carvalho, N.S., Gernar, M.J., Peters, K., Mindel, A., De Sutter, P., Bosch, F.X., David, M.P., Descamps, D., Struyf, F., and Dubin, G., *Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. 89-99.
86. Brown, D.R., Kjaer, S.K., Sigurdsson, K., Iversen, O.E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C.M., Perez, G., Koutsky, L.A., Tay, E.H., Garcia, P., Ault, K.A., Garland, S.M., Leodolter, S., Olsson, S.E., Tang, G.W., Ferris, D.G., Paavonen, J., Steben, M., Bosch, F.X., Dillner, J., Joura, E.A., Kurman, R.J., Majewski, S., Munoz, N., Myers, E.R., Villa, L.L., Taddeo, F.J., Roberts, C., Tadesse, A., Bryan, J., Lupinacci, L.C., Giacoletti, K.E., Sings, H.L., James, M., Hesley, T.M., and Barr, E., *The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16-26 years*. J Infect Dis, 2009. **199**(7): p. 926-35.
87. Wheeler, C.M., Castellsague, X., Garland, S.M., Szarewski, A., Paavonen, J., Naud, P., Salmeron, J., Chow, S.N., Apter, D., Kitchener, H., Teixeira, J.C., Skinner, S.R., Jaisamrarn, U., Limson, G., Romanowski, B., Aoki, F.Y., Schwarz, T.F., Poppe, W.A., Bosch, F.X., Harper, D.M., Huh, W., Hardt, K., Zahaf, T., Descamps, D., Struyf, F., Dubin, G., and Lehtinen, M., *Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. 100-10.
88. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
89. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-12.
90. Klose, R.J. and Bird, A.P., *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
91. Yano, S., Ghosh, P., Kusaba, H., Buchholz, M., and Longo, D.L., *Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2510-6.
92. Mikovits, J.A., Young, H.A., Vertino, P., Issa, J.P., Pitha, P.M., Turcoski-Corrales, S., Taub, D.D., Petrow, C.L., Baylin, S.B., and Ruscetti, F.W., *Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5166-77.
93. Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T., and Nakashima, K., *Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons*. J Neurosci Res, 2006. **84**(5): p. 969-79.
94. Jenuwein, T. and Allis, C.D., *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
95. Kónya, J., *Humán herpesvírusok*, in *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*, T. Pál, Editor. 2013, Medicina: Budapest. p. 173-82.
96. Ho, M., *Epidemiology of cytomegalovirus infections*. Rev Infect Dis, 1990. **12 Suppl 7**: p. S701-10.

97. Sinclair, J. and Sissons, P., *Latency and reactivation of human cytomegalovirus*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 1763-79.
98. Handsfield, H.H., Chandler, S.H., Caine, V.A., Meyers, J.D., Corey, L., Medeiros, E., and McDougall, J.K., *Cytomegalovirus infection in sex partners: evidence for sexual transmission*. J Infect Dis, 1985. **151**(2): p. 344-8.
99. Mocarski, E.S. and Courcelle, C.T., *Cytomegaloviruses and their replication*, in *Fields: Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2629-73.
100. Stenberg, R.M., *The human cytomegalovirus major immediate-early gene*. Intervirology, 1996. **39**(5-6): p. 343-9.
101. Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M., and Greaves, R.F., *A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11321-6.
102. Meier, J.L. and Stinski, M.F., *Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression*. Intervirology, 1996. **39**(5-6): p. 331-42.
103. Meier, J.L. and Stinski, M.F., *Effect of a modulator deletion on transcription of the human cytomegalovirus major immediate-early genes in infected undifferentiated and differentiated cells*. J Virol, 1997. **71**(2): p. 1246-55.
104. Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., and Ploegh, H.L., *Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11327-33.
105. Depto, A.S. and Stenberg, R.M., *Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1232-8.
106. Kondo, K., Xu, J., and Mocarski, E.S., *Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11137-42.
107. Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., and Sinclair, J.H., *Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 9): p. 2059-64.
108. Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., and Sinclair, J., *Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors*. J Gen Virol, 1996. **77** (Pt 12): p. 3099-102.
109. Sunde, P.T., Olsen, I., Enersen, M., Beiske, K., and Grinde, B., *Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology?* J Med Virol, 2008. **80**(6): p. 1007-11.
110. Chen, V., Chen, Y., Li, H., Kent, K., Baumgartner, J.C., and Machida, C.A., *Herpesviruses in abscesses and cellulitis of endodontic origin*. J Endod, 2009. **35**(2): p. 182-8.
111. Barnes, P.D. and Grundy, J.E., *Down-regulation of the class I HLA heterodimer and beta 2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus*. J Gen Virol, 1992. **73** (Pt 9): p. 2395-403.
112. Moutaftsi, M., Mehl, A.M., Borysiewicz, L.K., and Tabi, Z., *Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2913-21.
113. Frascaroli, G., Varani, S., Moepps, B., Sinzger, C., Landini, M.P., and Mertens, T., *Human cytomegalovirus subverts the functions of monocytes, impairing chemokine-mediated migration and leukocyte recruitment*. J Virol, 2006. **80**(15): p. 7578-89.
114. Kubota, A., Kubota, S., Farrell, H.E., Davis-Poynter, N., and Takei, F., *Inhibition of NK cells by murine CMV-encoded class I MHC homologue m144*. Cell Immunol, 1999. **191**(2): p. 145-51.
115. Mogensen, T.H. and Paludan, S.R., *Molecular pathways in virus-induced cytokine production*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(1): p. 131-50.

116. Wara-Aswapati, N., Boch, J.A., and Auron, P.E., *Activation of interleukin 1beta gene transcription by human cytomegalovirus: molecular mechanisms and relevance to periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(2): p. 67-71.
117. Krueger, G.R. and Ablashi, D.V., *Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior*. Intervirology, 2003. **46**(5): p. 257-69.
118. De Bolle, L., Naesens, L., and De Clercq, E., *Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(1): p. 217-45.
119. Ablashi, D., Agut, H., Alvarez-Lafuente, R., Clark, D.A., Dewhurst, S., DiLuca, D., Flamand, L., Frenkel, N., Gallo, R., Gompels, U.A., Hollsberg, P., Jacobson, S., Luppi, M., Lusso, P., Malnati, M., Medveczky, P., Mori, Y., Pellett, P.E., Pritchett, J.C., Yamanishi, K., and Yoshikawa, T., *Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses*. Arch Virol, 2014. **159**(5): p. 863-70.
120. Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S.E., Markham, P.D., and Gallo, R.C., *Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3*. J Immunol, 1991. **147**(2): p. 685-91.
121. Lusso, P., Malnati, M.S., Garzino-Demo, A., Crowley, R.W., Long, E.O., and Gallo, R.C., *Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6*. Nature, 1993. **362**(6419): p. 458-62.
122. Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M., and Yamanishi, K., *Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 6): p. 1401-8.
123. Kakimoto, M., Hasegawa, A., Fujita, S., and Yasukawa, M., *Phenotypic and functional alterations of dendritic cells induced by human herpesvirus 6 infection*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10338-45.
124. Luppi, M., Barozzi, P., Morris, C., Maiorana, A., Garber, R., Bonacorsi, G., Donelli, A., Marasca, R., Tabilio, A., and Torelli, G., *Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 754-9.
125. Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., and Kurata, T., *Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum*. Lancet, 1988. **1**(8594): p. 1065-7.
126. Razonable, R.R., Fanning, C., Brown, R.A., Espy, M.J., Rivero, A., Wilson, J., Kremers, W., Smith, T.F., and Paya, C.V., *Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant a occurs in critically ill immunocompetent hosts*. J Infect Dis, 2002. **185**(1): p. 110-3.
127. Lusso, P., *HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape*. J Clin Virol, 2006. **37** Suppl 1: p. S4-10.
128. Murakami, Y., Tanimoto, K., Fujiwara, H., An, J., Suemori, K., Ochi, T., Hasegawa, H., and Yasukawa, M., *Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling*. Virol J, 2010. **7**: p. 91.
129. Arena, A., Liberto, M.C., Iannello, D., Capozza, A.B., and Foca, A., *Altered cytokine production after human herpes virus type 6 infection*. New Microbiol, 1999. **22**(4): p. 293-300.
130. Odumade, O.A., Hogquist, K.A., and Balfour, H.H., Jr., *Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(1): p. 193-209.
131. Kieff, E. and Rickinson, A.B., *Epstein-Barr virus and its replication*, in *Fields: Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2511-73.
132. Young, L.S., Dawson, C.W., and Eliopoulos, A.G., *The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes*. Mol Pathol, 2000. **53**(5): p. 238-47.
133. Kienzle, N., Young, D.B., Liaskou, D., Buck, M., Greco, S., and Sculley, T.B., *Intron retention may regulate expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 3 family genes*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1195-204.
134. Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W., and Delecluse, H.J., *The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators*. EMBO J, 2000. **19**(12): p. 3080-9.

135. Yuan, J., Cahir-McFarland, E., Zhao, B., and Kieff, E., *Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2548-65.
136. Kenney, S., *Theodore E. Woodward Award: development of novel, EBV-targeted therapies for EBV-positive tumors*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2006. **117**: p. 55-73; discussion 73-4.
137. Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M.G., *Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12616-21.
138. Young, L.S. and Rickinson, A.B., *Epstein-Barr virus: 40 years on*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 757-68.
139. Sung, N.S., Kenney, S., Gutsch, D., and Pagano, J.S., *EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2164-9.
140. Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G.M., *Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23*. J Virol, 1990. **64**(3): p. 1002-13.
141. Faumont, N., Durand-Panteix, S., Schlee, M., Gromminger, S., Schuhmacher, M., Holzel, M., Laux, G., Mailhammer, R., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Bornkamm, G.W., and Feuillard, J., *c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 5014-27.
142. Nitsche, F., Bell, A., and Rickinson, A., *Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6619-28.
143. Robertson, E.S., Lin, J., and Kieff, E., *The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa)*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 3068-74.
144. Radkov, S.A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., and Allday, M.J., *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5688-97.
145. Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H., *Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses*. Science, 1999. **286**(5438): p. 300-3.
146. Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B., and Kieff, E.D., *The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5759-67.
147. Miller, C.L., Burkhardt, A.L., Lee, J.H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J.B., and Kieff, E., *Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases*. Immunity, 1995. **2**(2): p. 155-66.
148. Gregorovic, G., Bosshard, R., Karstegl, C.E., White, R.E., Pattle, S., Chiang, A.K., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Russ, R., and Farrell, P.J., *Cellular gene expression that correlates with EBV expression in Epstein-Barr Virus-infected lymphoblastoid cell lines*. J Virol, 2011. **85**(7): p. 3535-45.
149. Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K., and Takada, K., *Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3*. J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2091-9.
150. Amoroso, R., Fitzsimmons, L., Thomas, W.A., Kelly, G.L., Rowe, M., and Bell, A.I., *Quantitative studies of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs provide novel insights into their regulation*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 996-1010.
151. Rickinson, A.B. and Moss, D.J., *Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 405-31.

152. Tierney, R.J., Shannon-Lowe, C.D., Fitzsimmons, L., Bell, A.I., and Rowe, M., *Unexpected patterns of Epstein-Barr virus transcription revealed by a high throughput PCR array for absolute quantification of viral mRNA*. Virology, 2015. **474**: p. 117-30.
153. Masy, E., Adriaenssens, E., Montpellier, C., Crepieux, P., Mougel, A., Quatannens, B., Goormachtigh, G., Faumont, N., Meggetto, F., Auriault, C., Groux, H., and Coll, J., *Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6460-72.
154. Rochford, R., Cannon, M.J., Sabbe, R.E., Adusumilli, K., Picchio, G., Glynn, J.M., Noonan, D.J., Mosier, D.E., and Hobbs, M.V., *Common and idiosyncratic patterns of cytokine gene expression by Epstein-Barr virus transformed human B cell lines*. Viral Immunol, 1997. **10**(4): p. 183-95.
155. Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., and Young, L.S., *Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16085-96.
156. Rittner, H.L., Machelska, H., and Stein, C., *Leukocytes in the regulation of pain and analgesia*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(6): p. 1215-22.
157. Hahn, C.L. and Liewehr, F.R., *Update on the adaptive immune responses of the dental pulp*. J Endod, 2007. **33**(7): p. 773-81.
158. Ikuta, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., and Sairenji, T., *Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children*. Microbes Infect, 2000. **2**(2): p. 115-20.
159. Fazekas, Á., *Megtartó fogászat és endodoncia*. 2006: Semmelweis Kiadó. 256-260.
160. Fabricius, L., Dahlen, G., Ohman, A.E., and Moller, A.J., *Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure*. Scand J Dent Res, 1982. **90**(2): p. 134-44.
161. Moller, A.J., Fabricius, L., Dahlen, G., Sundqvist, G., and Happonen, R.P., *Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains*. Eur J Oral Sci, 2004. **112**(3): p. 207-15.
162. Douglass, A.B. and Douglass, J.M., *Common dental emergencies*. Am Fam Physician, 2003. **67**(3): p. 511-6.
163. Siqueira, J.F., Jung, I.Y., Rocas, I.N., and Lee, C.Y., *Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. **99**(5): p. 641-7.
164. Wayman, B.E., Murata, S.M., Almeida, R.J., and Fowler, C.B., *A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions*. J Endod, 1992. **18**(4): p. 152-5.
165. Marton, I.J. and Kiss, C., *Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(3): p. 139-50.
166. Walton, R.E. and Ardjmand, K., *Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys*. J Endod, 1992. **18**(5): p. 216-27.
167. Nair, P.N., Sjogren, U., Schumacher, E., and Sundqvist, G., *Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up*. Int Endod J, 1993. **26**(4): p. 225-33.
168. Yanagisawa, S., *Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies*. J Oral Pathol, 1980. **9**(5): p. 288-300.
169. Liapatas, S., Nakou, M., and Rontogianni, D., *Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study*. Int Endod J, 2003. **36**(7): p. 464-71.
170. Klemenc, P., Skaleric, U., Artnik, B., Nogrsek, P., and Marin, J., *Prevalence of some herpesviruses in gingival crevicular fluid*. J Clin Virol, 2005. **34**(2): p. 147-52.
171. Li, H., Chen, V., Chen, Y., Baumgartner, J.C., and Machida, C.A., *Herpesviruses in endodontic pathoses: association of Epstein-Barr virus with irreversible pulpitis and apical periodontitis*. J Endod, 2009. **35**(1): p. 23-9.
172. Sabeti, M., Simon, J.H., and Slots, J., *Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(5): p. 327-8.

173. Sabeti, M. and Slots, J., *Herpesviral-bacterial coinfection in periapical pathosis*. J Endod, 2004. **30**(2): p. 69-72.
174. Yazdi, K.A., Sabeti, M., Jabalameli, F., Eman eini, M., Kolahdouzan, S.A., and Slots, J., *Relationship between human cytomegalovirus transcription and symptomatic apical periodontitis in Iran*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(6): p. 510-4.
175. Contreras, A., Nowzari, H., and Slots, J., *Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(1): p. 15-8.
176. Cassai, E., Galvan, M., Trombelli, L., and Rotola, A., *HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. A case-control study*. J Clin Periodontol, 2003. **30**(3): p. 184-91.
177. Rotola, A., Cassai, E., Farina, R., Caselli, E., Gentili, V., Lazzarotto, T., and Trombelli, L., *Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(10): p. 831-7.
178. Sabeti, M., Simon, J.H., Nowzari, H., and Slots, J., *Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus active infection in periapical lesions of teeth with intact crowns*. J Endod, 2003. **29**(5): p. 321-3.
179. Sabeti, M., Valles, Y., Nowzari, H., Simon, J.H., Kermani-Arab, V., and Slots, J., *Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(2): p. 104-8.
180. Yildirim, S., Yapar, M., Kubar, A., and Slots, J., *Human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and bone resorption-inducing cytokines in periapical lesions of deciduous teeth*. Oral Microbiol Immunol, 2006. **21**(2): p. 107-11.
181. Sabeti, M., Kermani, V., Sabeti, S., and Simon, J.H., *Significance of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in inducing cytokine expression in periapical lesions*. J Endod, 2012. **38**(1): p. 47-50.
182. Griffin, D.E., *Measles virus*, in *Fields: Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1401-41.
183. Black, F.L., *Measles active and passive immunity in a worldwide perspective*. Prog Med Virol, 1989. **36**: p. 1-33.
184. Udem, S.A. and Cook, K.A., *Isolation and characterization of measles virus intracellular nucleocapsid RNA*. J Virol, 1984. **49**(1): p. 57-65.
185. Bellini, W.J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., and Richardson, C.D., *Measles virus P gene codes for two proteins*. J Virol, 1985. **53**(3): p. 908-19.
186. Cattaneo, R., Kaelin, K., Bacsko, K., and Billeter, M.A., *Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein*. Cell, 1989. **56**(5): p. 759-64.
187. Sidhu, M.S., Crowley, J., Lowenthal, A., Karcher, D., Menonna, J., Cook, S., Udem, S., and Dowling, P., *Defective measles virus in human subacute sclerosing panencephalitis brain*. Virology, 1994. **202**(2): p. 631-41.
188. Cattaneo, R., Schmid, A., Spielhofer, P., Kaelin, K., Bacsko, K., ter Meulen, V., Pardowitz, J., Flanagan, S., Rima, B.K., Udem, S.A., and et al., *Mutated and hypermutated genes of persistent measles viruses which caused lethal human brain diseases*. Virology, 1989. **173**(2): p. 415-25.
189. Wiet, R.J. and Causse, J., *Otosclerosis (otospongiosis)*. 2. ed. 2007, Alexandria, VA: American Academy of Otolaryngology--Head and Neck Surgery Foundation.
190. Cureoglu, S., Schachern, P.A., Ferlito, A., Rinaldo, A., Tsuprun, V., and Paparella, M.M., *Otosclerosis: etiopathogenesis and histopathology*. American Journal of Otolaryngology, 2006. **27**(5): p. 334-340.
191. Hinojosa, R. and Marion, M., *Otosclerosis and sensorineural hearing loss: A histopathologic study*. American Journal of Otolaryngology, 1987. **8**(5): p. 296-307.
192. Barr, M.S. and Lewin, J.S., *Computed tomographic evaluation of otosclerosis*. American Journal of Otolaryngology, 1993. **14**(4): p. 282-284.

193. Van Den Bogaert, K., Govaerts, P.J., De Leenheer, E.M., Schatteman, I., Verstreken, M., Chen, W., Declau, F., Cremers, C.W., Van De Heyning, P.H., Offeciers, F.E., Somers, T., Smith, R.J., and Van Camp, G., *Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes*. Bone, 2002. **30**(4): p. 624-30.
194. Chole, R.A. and McKenna, M., *Pathophysiology of otosclerosis*. Otol Neurotol, 2001. **22**(2): p. 249-57.
195. Grayeli, A.B., Sterkers, O., Roulleau, P., Elbaz, P., Ferrary, E., and Silve, C., *Parathyroid hormone-parathyroid hormone-related peptide receptor expression and function in otosclerosis*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E1005-12.
196. McKenna, M.J. and Mills, B.G., *Ultrastructural and immunohistochemical evidence of measles virus in active otosclerosis*. Acta Otolaryngol Suppl, 1990. **470**: p. 130-9; discussion 139-40.
197. McKenna, M.J., Mills, B.G., Galey, F.R., and Linthicum, F.H., Jr., *Filamentous structures morphologically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients*. Am J Otol, 1986. **7**(1): p. 25-8.
198. McKenna, M.J. and Mills, B.G., *Immunohistochemical evidence of measles virus antigens in active otosclerosis*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1989. **101**(4): p. 415-21.
199. Arnold, W., Niedermeyer, H.P., Lehn, N., Neubert, W., and Hofler, H., *Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear*. Acta Otolaryngol, 1996. **116**(5): p. 705-9.
200. Gyongyosi, E., Szalmas, A., Ferenczi, A., Konya, J., Gergely, L., and Veress, G., *Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes*. Virol J, 2012. **9**: p. 36.
201. Konya, J., Veress, G., Juhasz, A., Szarka, K., Sapy, T., Hernadi, Z., and Gergely, L., *Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(1): p. 408-11.
202. Veress, G., Konya, J., Csiky-Meszaros, T., Czegledy, J., and Gergely, L., *Human papillomavirus DNA and anti-HPV secretory IgA antibodies in cytologically normal cervical specimens*. J Med Virol, 1994. **43**(2): p. 201-7.
203. Konya, J., Veress, G., Hernadi, Z., Soos, G., Czegledy, J., and Gergely, L., *Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with prognostic factors in invasive cervical neoplasias*. J Med Virol, 1995. **46**(1): p. 1-6.
204. Czegledy, J., Iosif, C., Hansson, B.G., Evander, M., Gergely, L., and Wadell, G., *Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer?* Int J Cancer, 1995. **64**(3): p. 211-5.
205. Hesselink, A.T., Bulkman, N.W., Berkhof, J., Lorincz, A.T., Meijer, C.J., and Snijders, P.J., *Cross-sectional comparison of an automated hybrid capture 2 assay and the consensus GP5+/6+ PCR method in a population-based cervical screening program*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3680-5.
206. Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., and Kurman, R.J., *Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types*. Obstet Gynecol, 1992. **79**(3): p. 328-37.
207. Castle, P.E., Lorincz, A.T., Scott, D.R., Sherman, M.E., Glass, A.G., Rush, B.B., Wacholder, S., Burk, R.D., Manos, M.M., Schussler, J.E., Macomber, P., and Schiffman, M., *Comparison between prototype hybrid capture 3 and hybrid capture 2 human papillomavirus DNA assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4022-30.
208. Cox, J.T., Lorincz, A.T., Schiffman, M.H., Sherman, M.E., Cullen, A., and Kurman, R.J., *Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance*. Am J Obstet Gynecol, 1995. **172**(3): p. 946-54.

209. Meyer, T., Arndt, R., Beckmann, E.R., Padberg, B., Christophers, E., and Stockfleth, E., *Distribution of HPV 53, HPV 73 and CP8304 in genital epithelial lesions with different grades of dysplasia*. *Int J Gynecol Cancer*, 2001. **11**(3): p. 198-204.
210. Poljak, M., Marin, I.J., Seme, K., and Vince, A., *Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail*. *J Clin Virol*, 2002. **25 Suppl 3**: p. S89-97.
211. Szarewski, A., Mesher, D., Cadman, L., Austin, J., Ashdown-Barr, L., Ho, L., Terry, G., Liddle, S., Young, M., Stoler, M., McCarthy, J., Wright, C., Bergeron, C., Soutter, W.P., Lyons, D., and Cuzick, J., *Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study*. *J Clin Microbiol*, 2012. **50**(6): p. 1867-73.
212. Szoke, K., Sapy, T., Krasznai, Z., Hernadi, Z., Szladek, G., Veress, G., Dillner, J., Gergely, L., and Konya, J., *Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities*. *J Med Virol*, 2003. **71**(4): p. 585-92.
213. Hernadi, Z., Gazdag, L., Szoke, K., Sapy, T., Krasznai, Z.T., and Konya, J., *Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006. **125**(1): p. 114-9.
214. Schiffman, M.H., Kiviat, N.B., Burk, R.D., Shah, K.V., Daniel, R.W., Lewis, R., Kuypers, J., Manos, M.M., Scott, D.R., Sherman, M.E., and et al., *Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture*. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(3): p. 545-50.
215. Munoz, N., *Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence*. *J Clin Virol*, 2000. **19**(1-2): p. 1-5.
216. Ho, G.Y., Burk, R.D., Klein, S., Kadish, A.S., Chang, C.J., Palan, P., Basu, J., Tachezy, R., Lewis, R., and Romney, S., *Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(18): p. 1365-71.
217. Tachezy, R., Hamsikova, E., Hajek, T., Mikyskova, I., Smahel, M., Van Ranst, M., Kanka, J., Havrankova, A., Rob, L., Guttner, V., Slavik, V., Anton, M., Kratochvil, B., Kotrsova, L., and Vonka, V., *Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles*. *J Med Virol*, 1999. **58**(4): p. 378-86.
218. Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M.E., Hutchinson, M., Morales, J., Balmaceda, I., Greenberg, M.D., Alfaro, M., Burk, R.D., Wacholder, S., Plummer, M., and Schiffman, M., *Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(6): p. 464-74.
219. Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K.V., *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(11): p. 796-802.
220. Kalantari, M., Karlsen, F., Johansson, B., Sigurjonsson, T., Warleby, B., and Hagmar, B., *Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade: a study on 476 Stockholm women, using PCR for detection and typing of HPV*. *Hum Pathol*, 1997. **28**(8): p. 899-904.
221. Nindl, I., Lotz, B., Kuhne-Heid, R., Endisch, U., and Schneider, A., *Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay*. *J Clin Pathol*, 1999. **52**(1): p. 17-22.
222. Woodman, C.B., Collins, S., Rollason, T.P., Winter, H., Bailey, A., Yates, M., and Young, L.S., *Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia*. *Lancet*, 2003. **361**(9351): p. 40-3.

223. Hernadi, Z., Szoke, K., Sapy, T., Krasznai, Z.T., Soos, G., Veress, G., Gergely, L., and Konya, J., *Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **118**(2): p. 229-34.
224. Skjeldestad, F.E., Hagen, B., Lie, A.K., and Isaksen, C., *Residual and recurrent disease after laser conization for cervical intraepithelial neoplasia*. Obstet Gynecol, 1997. **90**(3): p. 428-33.
225. Reich, O., Pickel, H., Lahousen, M., Tamussino, K., and Winter, R., *Cervical intraepithelial neoplasia III: long-term outcome after cold-knife conization with clear margins*. Obstet Gynecol, 2001. **97**(3): p. 428-30.
226. Dobbs, S.P., Asmussen, T., Nunns, D., Hollingworth, J., Brown, L.J., and Ireland, D., *Does histological incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia following large loop excision of transformation zone increase recurrence rates? A six year cytological follow up*. BJOG, 2000. **107**(10): p. 1298-301.
227. Tate, J.E., Resnick, M., Sheets, E.E., and Crum, C.P., *Absence of papillomavirus DNA in normal tissue adjacent to most cervical intraepithelial neoplasms*. Obstet Gynecol, 1996. **88**(2): p. 257-60.
228. Elfgrén, K., Bistoletti, P., Dillner, L., Walboomers, J.M., Meijer, C.J., and Dillner, J., *Conization for cervical intraepithelial neoplasia is followed by disappearance of human papillomavirus deoxyribonucleic acid and a decline in serum and cervical mucus antibodies against human papillomavirus antigens*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(3): p. 937-42.
229. Kjellberg, L., Wadell, G., Bergman, F., Isaksson, M., Angstrom, T., and Dillner, J., *Regular disappearance of the human papillomavirus genome after conization of cervical dysplasia by carbon dioxide laser*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(5): p. 1238-42.
230. Bollen, L.J., Tjong, A.H.S.P., van der Velden, J., Mol, B.W., ten Kate, F.W., ter Schegget, J., and Bleker, O.P., *Prediction of recurrent and residual cervical dysplasia by human papillomavirus detection among patients with abnormal cytology*. Gynecol Oncol, 1999. **72**(2): p. 199-201.
231. Nagai, Y., Maehama, T., Asato, T., and Kanazawa, K., *Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence?* Gynecol Oncol, 2000. **79**(2): p. 294-9.
232. Nöbbenhuis, M.A., Meijer, C.J., van den Brule, A.J., Rozendaal, L., Voorhorst, F.J., Risse, E.K., Verheijen, R.H., and Helmerhorst, T.J., *Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia*. Br J Cancer, 2001. **84**(6): p. 796-801.
233. Konya, J. and Dillner, J., *Immunity to oncogenic human papillomaviruses*. Adv Cancer Res, 2001. **82**: p. 205-38.
234. Veress, G., Csiky-Meszaros, T., Konya, J., Czeglédy, J., and Gergely, L., *Follow-up of human papillomavirus (HPV) DNA and local anti-HPV antibodies in cytologically normal pregnant women*. Med Microbiol Immunol, 1996. **185**(3): p. 139-44.
235. Feher, E. and Szalmas, A., *Prevalence of Chlamydia trachomatis and oncogenic human papillomavirus types in cytologic atypia of the uterine cervix*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2006. **53**(4): p. 479-87.
236. Luostarinen, T., Lehtinen, M., Bjorge, T., Abeler, V., Hakama, M., Hallmans, G., Jellum, E., Koskela, P., Lenner, P., Lie, A.K., Paavonen, J., Pukkala, E., Saikku, P., Sigstad, E., Thoresen, S., Youngman, L.D., Dillner, J., and Hakulinen, T., *Joint effects of different human papillomaviruses and Chlamydia trachomatis infections on risk of squamous cell carcinoma of the cervix uteri*. Eur J Cancer, 2004. **40**(7): p. 1058-65.
237. Montoya, L., Saiz, I., Rey, G., Vela, F., and Clerici-Larradet, N., *Cervical carcinoma: human papillomavirus infection and HLA-associated risk factors in the Spanish population*. Eur J Immunogenet, 1998. **25**(5): p. 329-37.
238. Bontkes, H.J., Walboomers, J.M., Meijer, C.J., Helmerhorst, T.J., and Stern, P.L., *Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression*. Lancet, 1998. **351**(9097): p. 187-8.

239. Ellis, J.R., Keating, P.J., Baird, J., Hounsell, E.F., Renouf, D.V., Rowe, M., Hopkins, D., Duggan-Keen, M.F., Bartholomew, J.S., Young, L.S., and et al., *The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer*. Nat Med, 1995. **1**(5): p. 464-70.
240. Yamada, T., Wheeler, C.M., Halpern, A.L., Stewart, A.C., Hildesheim, A., and Jenison, S.A., *Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7743-53.
241. Apple, R.J., Becker, T.M., Wheeler, C.M., and Erlich, H.A., *Comparison of human leukocyte antigen DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(6): p. 427-36.
242. Apple, R.J., Erlich, H.A., Klitz, W., Manos, M.M., Becker, T.M., and Wheeler, C.M., *HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity*. Nat Genet, 1994. **6**(2): p. 157-62.
243. Duggan-Keen, M.F., Keating, P.J., Stevens, F.R., Sinnott, P., Snijders, P.J., Walboomers, J.M., Davidson, S., Hunter, R.D., Dyer, P.A., and Stern, P.L., *Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression*. Eur J Immunogenet, 1996. **23**(4): p. 275-84.
244. Glew, S.S., Duggan-Keen, M., Ghosh, A.K., Ivinson, A., Sinnott, P., Davidson, J., Dyer, P.A., and Stern, P.L., *Lack of association of HLA polymorphisms with human papillomavirus-related cervical cancer*. Hum Immunol, 1993. **37**(3): p. 157-64.
245. Sanjeevi, C.B., Hjelmstrom, P., Hallmans, G., Wiklund, F., Lenner, P., Angstrom, T., Dillner, J., and Lernmark, A., *Different HLA-DR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type-16 seropositive and seronegative Swedish women*. Int J Cancer, 1996. **68**(4): p. 409-14.
246. Allen, M., Kalantari, M., Ylitalo, N., Pettersson, B., Hagmar, B., Scheibenpflug, L., Johansson, B., Pettersson, U., and Gyllensten, U., *HLA DQ-DR haplotype and susceptibility to cervical carcinoma: indications of increased risk for development of cervical carcinoma in individuals infected with HPV 18*. Tissue Antigens, 1996. **48**(1): p. 32-7.
247. Bontkes, H.J., van Duin, M., de Gruijl, T.D., Duggan-Keen, M.F., Walboomers, J.M., Stukart, M.J., Verheijen, R.H., Helmerhorst, T.J., Meijer, C.J., Scheper, R.J., Stevens, F.R., Dyer, P.A., Sinnott, P., and Stern, P.L., *HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants*. Int J Cancer, 1998. **78**(2): p. 166-71.
248. Krul, E.J., Schipper, R.F., Schreuder, G.M., Fleuren, G.J., Kenter, G.G., and Melief, C.J., *HLA and susceptibility to cervical neoplasia*. Hum Immunol, 1999. **60**(4): p. 337-42.
249. Sastre-Garau, X., Loste, M.N., Vincent-Salomon, A., Favre, M., Mouret, E., de la Rochefordiere, A., Durand, J.C., Tartour, E., Lepage, V., and Charron, D., *Decreased frequency of HLA-DRB1 13 alleles in Frenchwomen with HPV-positive carcinoma of the cervix*. Int J Cancer, 1996. **69**(3): p. 159-64.
250. Gregoire, L., Lawrence, W.D., Kukuruga, D., Eisenbrey, A.B., and Lancaster, W.D., *Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women*. Int J Cancer, 1994. **57**(4): p. 504-7.
251. Helland, A., Borresen, A.L., Kristensen, G., and Ronningen, K.S., *DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(6): p. 479-86.
252. Helland, A., Olsen, A.O., Gjoen, K., Akselsen, H.E., Sauer, T., Magnus, P., Borresen-Dale, A.L., and Ronningen, K.S., *An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotype: a population-based case-control study of Norwegian women*. Int J Cancer, 1998. **76**(1): p. 19-24.

253. Hamsikova, E., Sramkova, I., Loudova, M., Ludvikova, V., Rob, L., and Vonka, V., *The frequency of HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in cervical cancer cases in the Czech Republic*. Folia Biol (Praha), 1999. **45**(1): p. 31-4.
254. Odunsi, K., Terry, G., Ho, L., Bell, J., Cuzick, J., and Ganesan, T.S., *Susceptibility to human papillomavirus-associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles*. Int J Cancer, 1996. **67**(5): p. 595-602.
255. Syrjanen, K., Nurmi, T., Mantyjarvi, R., Ilonen, J., Syrjanen, S., Surcel, H.M., Yliskoski, M., Vayrynen, M., Chang, F., and Saarikoski, S., *HLA types in women with cervical human papillomavirus (HPV) lesions prospectively followed up for 10 years*. Cytopathology, 1996. **7**(2): p. 99-107.
256. Wank, R. and Thomssen, C., *High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3*. Nature, 1991. **352**(6337): p. 723-5.
257. Hildesheim, A., Schiffman, M., Scott, D.R., Marti, D., Kissner, T., Sherman, M.E., Glass, A.G., Manos, M.M., Lorincz, A.T., Kurman, R.J., Buckland, J., Rush, B.B., and Carrington, M., *Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998. **7**(11): p. 1035-41.
258. Glew, S.S., Stern, P.L., Davidson, J.A., and Dyer, P.A., *HLA antigens and cervical carcinoma*. Nature, 1992. **356**(6364): p. 22.
259. David, A.L., Taylor, G.M., Gokhale, D., Aplin, J.D., Seif, M.W., and Tindall, V.R., *HLA-DQB1*03 and cervical intraepithelial neoplasia type III*. Lancet, 1992. **340**(8810): p. 52.
260. Mehal, W.Z., Lo, Y.M., Herrington, C.S., Evans, M.F., Papadopoulos, M.C., Odunsi, K., Ganesan, T.S., McGee, J.O., Bell, J.I., and Fleming, K.A., *Role of human papillomavirus in determining the HLA associated risk of cervical carcinogenesis*. J Clin Pathol, 1994. **47**(12): p. 1077-81.
261. Szoke, K., Szalmas, A., Szladek, G., Veress, G., Gergely, L., Toth, F.D., and Konya, J., *IL-10 promoter nt -1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix*. J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(4): p. 245-51.
262. Jacobs, N., Giannini, S.L., Doyen, J., Baptista, A., Moutschen, M., Boniver, J., and Delvenne, P., *Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix*. Clin Exp Immunol, 1998. **111**(1): p. 219-24.
263. Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G., *Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3188-93.
264. Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Zhan, D., Pecorelli, S., Parham, G.P., and Cannon, M.J., *Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5402-10.
265. Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., and Gallagher, G., *Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence*. Immunogenetics, 1997. **46**(2): p. 120-8.
266. Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I., and Woo, P., *Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(6): p. 1101-8.
267. Rees, L.E., Wood, N.A., Gillespie, K.M., Lai, K.N., Gaston, K., and Mathieson, P.W., *The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(3): p. 560-9.
268. Stanczuk, G.A., Sibanda, E.N., Perrey, C., Chirara, M., Pravica, V., Hutchinson, I.V., and Tswana, S.A., *Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production*. Int J Cancer, 2001. **94**(6): p. 792-4.
269. Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P.J., and Hutchinson, I.V., *An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter*. Eur J Immunogenet, 1997. **24**(1): p. 1-8.

270. Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T., and Tiegs, G., *IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice*. Hepatology, 2007. **45**(2): p. 475-85.
271. Wang, S.S., Bratti, M.C., Rodriguez, A.C., Herrero, R., Burk, R.D., Porras, C., Gonzalez, P., Sherman, M.E., Wacholder, S., Lan, Z.E., Schiffman, M., Chanock, S.J., and Hildesheim, A., *Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer*. J Infect Dis, 2009. **199**(1): p. 20-30.
272. Matsumoto, K., Oki, A., Satoh, T., Okada, S., Minaguchi, T., Onuki, M., Ochi, H., Nakao, S., Sakurai, M., Abe, A., Hamada, H., and Yoshikawa, H., *Interleukin-10 -1082 gene polymorphism and susceptibility to cervical cancer among Japanese women*. Jpn J Clin Oncol, 2010. **40**(11): p. 1113-6.
273. Szalmas, A., Banati, F., Koroknai, A., Laszlo, B., Feher, E., Salamon, D., Gergely, L., Minarovits, J., and Konya, J., *Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells*. Eur J Cancer, 2008. **44**(7): p. 1030-8.
274. Teunissen, M.B., Koomen, C.W., Jansen, J., de Waal Malefyt, R., Schmitt, E., Van den Wijngaard, R.M., Das, P.K., and Bos, J.D., *In contrast to their murine counterparts, normal human keratinocytes and human epidermoid cell lines A431 and HaCaT fail to express IL-10 mRNA and protein*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(1): p. 213-23.
275. Hazelbag, S., Fleuren, G.J., Baelde, J.J., Schuurin, E., Kenter, G.G., and Gorter, A., *Cytokine profile of cervical cancer cells*. Gynecol Oncol, 2001. **83**(2): p. 235-43.
276. Travagli, J., Letourneur, M., Bertoglio, J., and Pierre, J., *STAT6 and Ets-1 form a stable complex that modulates Socs-1 expression by interleukin-4 in keratinocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35183-92.
277. Grinstein, E., Jundt, F., Weinert, I., Wernet, P., and Royer, H.D., *Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells*. Oncogene, 2002. **21**(10): p. 1485-92.
278. Maytin, E.V. and Habener, J.F., *Transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(3): p. 238-46.
279. Salamon, D., Takacs, M., Ujvari, D., Uhlig, J., Wolf, H., Minarovits, J., and Niller, H.H., *Protein-DNA binding and CpG methylation at nucleotide resolution of latency-associated promoters Qp, Cp, and LMP1p of Epstein-Barr virus*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2584-96.
280. Kuo, M.H. and Allis, C.D., *In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment*. Methods, 1999. **19**(3): p. 425-33.
281. Mocellin, S., Panelli, M.C., Wang, E., Nagorsen, D., and Marincola, F.M., *The dual role of IL-10*. Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 36-43.
282. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
283. Steinke, J.W., Barekzi, E., Hagman, J., and Borish, L., *Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by sp1*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3215-22.
284. Steinke, J.W., Barekzi, E., Huyett, P., and Borish, L., *Differential interleukin-10 production stratified by -571 promoter polymorphism in purified human immune cells*. Cell Immunol, 2007. **249**(2): p. 101-7.
285. Brenner, S., Prosch, S., Schenke-Layland, K., Riese, U., Gausmann, U., and Platzer, C., *cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5597-604.
286. Grenningloh, R., Kang, B.Y., and Ho, I.C., *Ets-1, a functional cofactor of T-bet, is essential for Th1 inflammatory responses*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 615-26.
287. Staples, K.J., Smallie, T., Williams, L.M., Foey, A., Burke, B., Foxwell, B.M., and Ziegler-Heitbrock, L., *IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4779-85.

288. Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D., *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. Nat Genet, 2007. **39**(4): p. 457-66.
289. Murayama, A., Sakura, K., Nakama, M., Yasuzawa-Tanaka, K., Fujita, E., Tateishi, Y., Wang, Y., Ushijima, T., Baba, T., Shibuya, K., Shibuya, A., Kawabe, Y., and Yanagisawa, J., *A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1081-92.
290. Szalmas, A. and Konya, J., *Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(3): p. 144-52.
291. Kalantari, M., Calleja-Macias, I.E., Tewari, D., Hagmar, B., Lie, K., Barrera-Saldana, H.A., Wiley, D.J., and Bernard, H.U., *Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 12762-72.
292. Wooldridge, T.R. and Laimins, L.A., *Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding*. Virology, 2008. **374**(2): p. 371-80.
293. Kalantari, M., Lee, D., Calleja-Macias, I.E., Lambert, P.F., and Bernard, H.U., *Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines*. Virology, 2008. **374**(2): p. 292-303.
294. Kim, K., Garner-Hamrick, P.A., Fisher, C., Lee, D., and Lambert, P.F., *Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection*. J Virol, 2003. **77**(23): p. 12450-9.
295. Van Tine, B.A., Kappes, J.C., Banerjee, N.S., Knops, J., Lai, L., Steenbergen, R.D., Meijer, C.L., Snijders, P.J., Chatis, P., Broker, T.R., Moen, P.T., Jr., and Chow, L.T., *Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11172-86.
296. Turan, T., Kalantari, M., Calleja-Macias, I.E., Cubie, H.A., Cuschieri, K., Villa, L.L., Skomedal, H., Barrera-Saldana, H.A., and Bernard, H.U., *Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression?* Virology, 2006. **349**(1): p. 175-83.
297. Badal, S., Badal, V., Calleja-Macias, I.E., Kalantari, M., Chuang, L.S., Li, B.F., and Bernard, H.U., *The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation*. Virology, 2004. **324**(2): p. 483-92.
298. Thain, A., Jenkins, O., Clarke, A.R., and Gaston, K., *CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 7233-5.
299. Vinokurova, S. and von Knebel Doeberitz, M., *Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24451.
300. Chaiwongkot, A., Vinokurova, S., Pientong, C., Ekalaksananan, T., Kongyingyoes, B., Kleeckaow, P., Chumworathayi, B., Patarapadungkit, N., Reuschenbach, M., and von Knebel Doeberitz, M., *Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions*. Int J Cancer, 2013. **132**(9): p. 2087-94.
301. Kalantari, M., Osann, K., Calleja-Macias, I.E., Kim, S., Yan, B., Jordan, S., Chase, D.M., Tewari, K.S., and Bernard, H.U., *Methylation of human papillomavirus 16, 18, 31, and 45 L2 and L1 genes and the cellular DAPK gene: Considerations for use as biomarkers of the progression of cervical neoplasia*. Virology, 2014. **448**: p. 314-21.
302. Vasiljevic, N., Scibior-Bentkowska, D., Brentnall, A., Cuzick, J., and Lorincz, A., *A comparison of methylation levels in HPV18, HPV31 and HPV33 genomes reveals similar associations with cervical precancers*. J Clin Virol, 2013. **59**(3): p. 161-6.
303. Wentzensen, N., Sun, C., Ghosh, A., Kinney, W., Mirabello, L., Wacholder, S., Shaber, R., LaMere, B., Clarke, M., Lorincz, A.T., Castle, P.E., Schiffman, M., and Burk, R.D., *Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(22): p. 1738-49.

304. László, B., Madar, L., Ferenczi, A., Gyöngyösi, E., Szalmás, A., Szakács, L., Veress, G., and Kónya, J. *Long control region (LCR) CpG methylation in human papillomavirus (HPV) type 31 infections.* in *Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology and EU FP-7 PROMISE Regional Meeting.* 2014. Keszthely, Hungary: ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 62:(Supplement) pp. 55-56. (2015).
305. Ferenczi, A., Gyongyosi, E., Szalmas, A., Hernadi, Z., Toth, Z., Konya, J., and Veress, G., *Sequence variation of human papillomavirus type 31 long control region: phylogenetic and functional implications.* J Med Virol, 2013. **85**(5): p. 852-9.
306. Szalmas, A., Gyongyosi, E., Ferenczi, A., Laszlo, B., Karosi, T., Csomor, P., Gergely, L., Veress, G., and Konya, J., *Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein.* Virol J, 2013. **10**: p. 79.
307. Kong, L., Deng, Z., Zhao, Y., Wang, Y., Sarkar, F.H., and Zhang, Y., *Down-regulation of phospho-non-receptor Src tyrosine kinases contributes to growth inhibition of cervical cancer cells.* Med Oncol, 2011. **28**(4): p. 1495-506.
308. Yasmeen, A., Alachkar, A., Dekhil, H., Gambacorti-Passerini, C., and Al Moustafa, A.E., *Locking Src/Abl Tyrosine Kinase Activities Regulate Cell Differentiation and Invasion of Human Cervical Cancer Cells Expressing E6/E7 Oncoproteins of High-Risk HPV.* J Oncol, 2010. **2010**.
309. Korzeniewski, N., Spardy, N., Duensing, A., and Duensing, S., *Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses.* Cancer Lett, 2011. **305**(2): p. 113-22.
310. Hamamura, K., Tsuji, M., Hotta, H., Ohkawa, Y., Takahashi, M., Shibuya, H., Nakashima, H., Yamauchi, Y., Hashimoto, N., Hattori, H., Ueda, M., and Furukawa, K., *Functional activation of Src family kinase yes protein is essential for the enhanced malignant properties of human melanoma cells expressing ganglioside GD3.* J Biol Chem, 2011. **286**(21): p. 18526-37.
311. Lee, J.H., Pyon, J.K., Kim, D.W., Lee, S.H., Nam, H.S., Kim, C.H., Kang, S.G., Lee, Y.J., Park, M.Y., Jeong, D.J., and Cho, M.K., *Elevated c-Src and c-Yes expression in malignant skin cancers.* J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**: p. 116.
312. Sancier, F., Dumont, A., Sirvent, A., Paquay de Plater, L., Edmonds, T., David, G., Jan, M., de Montrion, C., Coge, F., Leonce, S., Burbridge, M., Bruno, A., Boutin, J.A., Lockhart, B., Roche, S., and Cruzalegui, F., *Specific oncogenic activity of the Src-family tyrosine kinase c-Yes in colon carcinoma cells.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17237.
313. Hernadi, K., Szalmas, A., Mogyrosi, R., Czompa, L., Veress, G., Csoma, E., Marton, I., and Konya, J., *Prevalence and activity of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis lesions.* J Endod, 2010. **36**(9): p. 1485-9.
314. Hernadi, K., Csoma, E., Adam, B., Szalmas, A., Gyongyosi, E., Veress, G., Ildiko, M., and Konya, J., *Association of human herpesvirus 6 subtypes with symptomatic apical periodontitis.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011. **112**(3): p. 401-6.
315. Hernadi, K., Gyongyosi, E., Meszaros, B., Szakacs, L., Szalmas, A., Csoma, E., Mogyrosi, R., Czompa, L., Veress, G., Varga, I., Marton, I.J., and Konya, J., *Elevated tumor necrosis factor-alpha expression in periapical lesions infected by Epstein-Barr virus.* J Endod, 2013. **39**(4): p. 456-60.
316. Saboia-Dantas, C.J., Coutrin de Toledo, L.F., Sampaio-Filho, H.R., and Siqueira, J.F., Jr., *Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach.* Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(5): p. 320-5.
317. Menezes, R., Garlet, T.P., Trombone, A.P., Repeke, C.E., Letra, A., Granjeiro, J.M., Campanelli, A.P., and Garlet, G.P., *The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis.* J Endod, 2008. **34**(12): p. 1480-4.
318. Danin, J., Linder, L.E., Lundqvist, G., and Andersson, L., *Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000. **90**(4): p. 514-7.
319. Boyce, B.F., Li, P., Yao, Z., Zhang, Q., Badell, I.R., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., and Xing, L., *TNF-alpha and pathologic bone resorption.* Keio J Med, 2005. **54**(3): p. 127-31.

320. Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
321. Flaman, L., Gosselin, J., D'Addario, M., Hiscott, J., Ablashi, D.V., Gallo, R.C., and Menezes, J., *Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures*. J Virol, 1991. **65**(9): p. 5105-10.
322. Martinho, F.C., Chiesa, W.M., Leite, F.R., Cirelli, J.A., and Gomes, B.P., *Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content*. J Endod, 2012. **38**(6): p. 740-5.
323. Karosi, T., Konya, J., Szabo, L.Z., and Sziklai, I., *Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples*. Otol Neurotol, 2004. **25**(4): p. 451-6.
324. Karosi, T., Konya, J., Petko, M., and Sziklai, I., *Histologic otosclerosis is associated with the presence of measles virus in the stapes footplate*. Otol Neurotol, 2005. **26**(6): p. 1128-33.
325. Karosi, T., Konya, J., Szabo, L.Z., Pytel, J., Jori, J., Szalmas, A., and Sziklai, I., *Codetection of measles virus and tumor necrosis factor-alpha mRNA in otosclerotic stapes footplates*. Laryngoscope, 2005. **115**(7): p. 1291-7.
326. Wang, P.C., Merchant, S.N., McKenna, M.J., Glynn, R.J., and Nadol, J.B., Jr., *Does otosclerosis occur only in the temporal bone?* Am J Otol, 1999. **20**(2): p. 162-5.
327. Konya, J., Molnar, S., Magyar, M.T., Szekeres, C.C., Kerenyi, L., and Csiba, L., *Severity of carotid atherosclerosis unrelated to Chlamydia pneumoniae infection in acute ischemic stroke patients: a clinicopathological study*. Cerebrovasc Dis, 2008. **25**(1-2): p. 170-5.
328. Kónya, J., Kerenyi, I., Molnar, S., Magyar, T., Ida, Y., Ritter, M., and Csiba, L. *Correlation between the severity of carotid atherosclerosis and Chlamydia pneumoniae infection in acute stroke patients*. in *5th World Stroke Conference*. 2004. Vancouver, Canada: STROKE 35:(6) p. E236.
329. Friedmann, I. and Arnold, W., *Pathology of the ear*. 1993, Edinburgh, UK: Churchill Livingstone. 774.
330. Karosi, T., Konya, J., Petko, M., Szabo, L.Z., Pytel, J., Jori, J., and Sziklai, I., *Antimeasles immunoglobulin g for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss*. Laryngoscope, 2006. **116**(3): p. 488-93.
331. Karosi, T., Szalmas, A., Csomor, P., Konya, J., Petko, M., and Sziklai, I., *Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis*. Laryngoscope, 2008. **118**(9): p. 1669-76.
332. Arnold, W. and Friedmann, I., *Immunohistochemistry of otosclerosis*. Acta Otolaryngol Suppl, 1990. **470**: p. 124-8; discussion 128-9.
333. Reddy, S.V. and Roodman, G.D., *Control of osteoclast differentiation*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1998. **8**(1): p. 1-17.
334. Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S.K., Fortun, Y., Redini, F., and Heymann, D., *The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(6): p. 457-75.
335. Karosi, T., Jokay, I., Konya, J., Szabo, L.Z., Pytel, J., Jori, J., Szalmas, A., and Sziklai, I., *Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylotic Stapes footplates in connection with measles virus positivity*. Laryngoscope, 2006. **116**(8): p. 1427-33.
336. Karosi, T., Csomor, P., Szalmas, A., Konya, J., Petko, M., and Sziklai, I., *Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2011. **268**(3): p. 357-65.

Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impaktfaktora: 50,3

Független hivatkozások az értekezést alapozó közleményekre: 273

Kónya J, Veress G, Juhász A, Szarka K, Sápó T, Hernádi Z, Gergely L

Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 38: pp. 408-411. (2000)

IF: 3.503

Kónya J, Dillner J

Immunity to oncogenic human papillomaviruses

ADVANCES IN CANCER RESEARCH 82: pp. 205-238. (2001)

IF: 11.192

Szőke K, Sápó T, Krasznai Z, Hernádi F, Szládek G, Veress G, Dillner J, Gergely L, Kónya J
Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities

JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 71:(4) pp. 585-592. (2003)

IF: 2.371

Karosi T, **Kónya J**, Szabo LZ, Sziklai I

Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples

OTOLOGY & NEUROTOLOGY 25:(4) pp. 451-456. (2004)

IF: 1.219

Szőke K, Szalmás A, Szládek G, Veress G, Gergely L, Tóth FD, Kónya J

IL-10 promoter nt-1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix

JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH 24:(4) pp. 245-251. (2004)

IF: 2.593

Hernádi Z, Szőke K, Sápó T, Krasznai ZT, Soós G, Veress G, Gergely L, Kónya J

Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions

EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY

118:(2) pp. 229-234. (2005)

IF: 1.141

Karosi T, **Kónya J**, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Szalmás A, Sziklai I

Codetection of measles virus and tumor necrosis factor- α mRNA in otosclerotic stapes footplates

LARYNGOSCOPE 115:(7) pp. 1291-1297. (2005)

IF: 1.617

Karosi T, **Kónya J**, Petko M, Sziklai I

Histologic otosclerosis is associated with the presence of measles virus in the stapes footplate

OTOLOGY & NEUROTOLOGY 26:(6) pp. 1128-1133. (2005)

IF: 1.340

Hernádi Z, Gazdag L, Szőke K, Sápó T, Krasznai ZT, **Kónya J**

Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia

EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY

125:(1) pp. 114-119. (2006)

IF: 1.273

Kónya J, Molnar S, Magyar M T, Szekeres C C, Kerenyi L, Csiba L
Severity of carotid atherosclerosis unrelated to Chlamydia pneumoniae infection in acute ischemic stroke patients: A clinicopathological study
CEREBROVASCULAR DISEASES 25:(1-2) pp. 170-175. (2008)
IF: 3.041

Szalmás A, Banati F, Koroknai A, Laszlo B, Feher E, Salamon D, Gergely L, Minarovits J, **Kónya J**
Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 44:(7) pp. 1030-1038. (2008)
IF: 4.475

Szalmás A, **Kónya J**
Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis
SEMINARS IN CANCER BIOLOGY 19:(3) pp. 144-152. (2009)
IF: 6.918

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.
JOURNAL OF ENDODONTICS 36:(9) pp. 1485-1489. (2010)
IF: 3.291

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 SURGERY ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY ORAL RADIOLOGY AND ENDODONTICS 112:(3) pp. 401-406. (2011)
IF: 1.457

Hernádi K, Gyöngyösi E, Mészáros B, Szakács L, Szalmás A, Csoma E, Mogyorósi R, Czompa L, Veress G, Varga I, Márton IJ, **Kónya J**
Elevated Tumor Necrosis Factor-alpha Expression in Periapical Lesions Infected by Epstein-Barr Virus
JOURNAL OF ENDODONTICS 39:(4) pp. 456-460. (2013)
IF: 2.788

Szalmás A, Gyöngyösi E, Ferenczi A, László B, Karosi T, Csomor P, Gergely L, Veress G, **Kónya J**
Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein
VIROLOGY JOURNAL 10: Paper 79. 9 p. (2013)
IF: 2.089

Egyéb idegennyelvű közlemények

Czeplédy J, Veress G, **Kónya J**, Gergely L

Genital human papillomavirus (HPV) infection in Hungarian women
ACTA MICROBIOLOGICA HUNGARICA 40: pp. 115-122. (1993)

Veress G, **Kónya J**, Csiky-Mészáros T, Czeplédy J, Gergely L

Human papillomavirus DNA and anti-HPV secretory IgA antibodies in cytologically normal cervical specimens
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 43: pp. 201-207. (1994)
 IF: 2.246

Kónya J, Veress G, Hernádi Z, Soós G, Czeplédy J, Gergely L

Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with prognostic factors in invasive cervical neoplasias
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 46:(1) pp. 1-6. (1995)
 IF: 2.232

Veress G, Csiky-Mészáros T, **Kónya J**, Czeplédy J, Gergely L

Follow-up of human papillomavirus (HPV) DNA and local anti-HPV antibodies in cytologically normal pregnant women
MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY 185: pp. 139-144. (1996)
 IF: 1.857

Kónya J, Eklund C, afGeijersstam V, Yuan F, Stuber G, Dillner J

Identification of a cytotoxic T-lymphocyte epitope in the human papillomavirus type 16 E2 protein
JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 78: pp. 2615-2620. (1997)
 IF: 2.863

Kónya J, Stuber G, Bjorndal A, Fenyo EM, Dillner J

Primary induction of human cytotoxic lymphocytes against a synthetic peptide of the human immunodeficiency virus type 1 protease
JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 78: pp. 2217-2224. (1997)
 IF: 2.863

Wang ZH, **Kónya J**, AvallLundkvist E, Sapp M, Dillner J, Dillner L

Human papillomavirus antibody responses among patients with incident cervical carcinoma
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 52:(4) pp. 436-440. (1997)
 IF: 3.188

Szarka K, Veress G, **Kónya J**, Gergely L

Frequency of p53 codon 72 genotypes in human papillomavirus associated squamous intraepithelial lesions and cervical cancer
ANTICANCER RESEARCH 19: pp. 2377-2379. (1999)
 IF: 1.375

Sápy T, Hernadi Z, **Kónya J**, Lukacsko L

Poor clinical outcome in early stage cervical cancer with human papillomavirus-18 positive lymph nodes
EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY 90:(1) pp. 93-95. (2000)
 IF: 0.703

Szarka K, Veress G, Juhász A, **Kónya J**, Sápy T, Soós G, Hernádi Z, Gergely L

Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers
ANTICANCER RESEARCH 20: pp. 2161-2167. (2000)
 IF: 1.331

Bacsi A, Csoma E, Beck Z, Andirko I, **Kónya J**, Gergely L, Toth FD

Induction of HIV-1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha
JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH 21: pp. 1079-1088. (2001)
 IF: 2.281

Juhász A, Remenyik E, **Kónya J**, Veress G, Bégány A, Andirkó I, Medgyessy I, Hunyadi J, Gergely L
Prevalence and age distribution of human herpesvirus-8 specific antibodies in Hungarian blood donors
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 64: pp. 526-530. (2001)
IF: 2.881

Juhász A, **Kónya J**, Beck Z, Remenyik E, Veress G, Bégány A, Medgyessy I, Hunyadi J, Gergely L
HHV-8 ELISA based on a one-step affinity capture of biotinylated K8.1 antigen
JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 94: pp. 163-172. (2001)
IF: 1.768

Szöke K, Szládek G, Szarka K, Juhász A, Veress G, Gergely L, **Kónya J**
Human cytomegalovirus load in the peripheral blood determined by quantitative competitive polymerase chain reaction
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 48: pp. 313-321. (2001)

Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhász A, **Kónya J**, Gergely L
Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 37: pp. 1946-1952. (2001)
IF: 3.460

Csoma E, Bácsi A, Liu X, Szabó J, Ebbesen P, Beck Z, **Kónya J**, Andirkó I, Nagy E, D. Tóth F
Human herpesvirus 6 variant A infects human term sincytiotrophoblasts in vitro and induces replication of human immunodeficiency virus type 1 in dually infected cells
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 67: pp. 67-87. (2002)
IF: 2.629

Banhegyi D, Bacs A, Toth FD, Prohaszka Z, Horvath A, Beck Z, **Kónya J**, Fust G
Significant decrease of the enhancement/neutralization index in HIV patients during highly active antiretroviral therapy (HAART)
IMMUNOLOGY LETTERS 89:(1) pp. 25-30. (2003)
IF: 1.710

BECK Z, BÁCSI A, LIU X, EBBESEN P, ANDIRKÓ I, CSOMA E, **KÓNYA J**, NAGY E, TÓTH FD
Differential patterns of Human Cytomeglavovirus gene expression in Various T-cell lines carrying human T-cell leukemia-lymphoma virus Type I: role of Tax-activated cellular transcription factors
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 71: pp. 94-104. (2003)
IF: 2.371

Nagy E, Beck Z, Kiss A, Csoma E, Telek B, **Kónya J**, Olah E, Rak K, Toth FD
Frequent methylation of p16(INK4A) and p14(ARF) genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 39:(16) pp. 2298-2305. (2003)
IF: 3.694

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
ARCHIVES OF VIROLOGY 148: pp. 841-851. (2003)
IF: 1.876

Murvai M, Borbély AA, **Kónya J**, Gergely L, Veress G
Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor-beta (TGF-beta 2) promoter
ARCHIVES OF VIROLOGY 149:(12) pp. 2379-2392. (2004)
IF: 1.841

Karosi T, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Sziklai I
Two subgroups of Stapes fixation: Otosclerosis and pseudo-otosclerosis
LARYNGOSCOPE 115:(11) pp. 1968-1973. (2005)
IF: 1.617

Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Marton 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 58:(4) pp. 402-405. (2005)

IF: 2.170

Borbély AA, Murvai M, **Kónya J**, Beck Z, Gergely L, Li F, Veress G
Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression

JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 87:(Part 2) pp. 287-294. (2006)

IF: 3.110

Csoma E, Deli T, **Kónya J**, Csernoch L, Beck Z, Gergely L

Human herpesvirus 6A decreases the susceptibility of macrophages to R5 variants of human immunodeficiency
virus 1: Possible role of RANTES and IL-8

VIRUS RESEARCH 121:(2) pp. 161-168. (2006)

IF: 2.783

Karosi T, Jokay I, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Sziklai I

Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis

LARYNGOSCOPE 116:(8) pp. 1478-1484. (2006)

IF: 1.736

Karosi T, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Sziklai I

Antimeasles immunoglobulin G for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss

LARYNGOSCOPE 116:(3) pp. 488-493. (2006)

IF: 1.736

Karosi T, Jokay I, **Kónya J**, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Szalmas A, Sziklai I

Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylotic staples footplates in connection with measles
virus positivity

LARYNGOSCOPE 116:(8) pp. 1427-1433. (2006)

IF: 1.736

Borbély AA, Murvai M, Szarka K, **Kónya J**, Gergely L, Hernádi Z, Veress G

Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis

JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 60:(3) pp. 303-306. (2007)

IF: 2.426

Karosi T, Jokay I, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Sziklai I

Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates

EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 264:(6) pp. 607-613. (2007)

IF: 0.648

Karosi T, Szalmas A, Csomor P, **Kónya J**, Petko M, Sziklai I

Disease-Associated Novel CD46 Splicing Variants and Pathologic Bone Remodeling in Otosclerosis

LARYNGOSCOPE 118:(9) pp. 1669-1676. (2008)

IF: 1.877

Sapy T, Poka R, Szarka K, **Kónya J**, Huga S, Hernadi Z

Age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with
positive cytology

EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY 138:(2) pp.
194-198. (2008)

IF: 1.565

László B, Nyúl Z, Kisfali P, Deák J, Kovács J, **Kónya J**, Mészner Z, Molnár P, Pátri L, Schneider F, Tóth A,
Melegh B, Iturriza-Gomara M, Gray J, Martella V, Szucs G, Bányai K

First detection of P[6],G9 rotaviruses in Hungary - An imported strain from India?

JOURNAL OF TRAVEL MEDICINE 16:(2) pp. 141-143. (2009)

IF: 1.503

- Szabó J, Dombrádi Zs, Dobay O, Orosi P, **Kónya J**, Nagy K, Rozgonyi F
Phenotypic and genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the university hospitals of Debrecen
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES 28:(2) pp. 129-136. (2009)
IF: 2.605
- Csomor P, Szalmas A, **Kónya J**, Sziklai I, Karosi T
Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants
EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 267:(2) pp. 219-226. (2010)
IF: 1.214
- Szalmas A, **Kónya J**, Sziklai I, Karosi T
Detection and identification of CD46 splicing isoforms by nested RT-PCR
METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 630: pp. 83-95. (2010)
- Csoma E, Mészáros B, Asztalos L, **Kónya J**, Gergely L
Prevalence of WU and KI polyomaviruses in plasma, urine, and respiratory samples from renal transplant patients
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 83:(7) pp. 1275-1278. (2011)
IF: 2.820
- Csoma E, Mészáros B, Gáll T, Asztalos L, **Kónya J**, Gergely L
Dominance of variant A in Human Herpesvirus 6 viraemia after renal transplantation
VIROLOGY JOURNAL 8: Paper 403. 5 p. (2011)
IF: 2.343
- Karosi T, Csomor P, Szalmas A, **Kónya J**, Petko M, Sziklai I
Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity
EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 268:(3) pp. 357-365. (2011)
IF: 1.287
- Otvos R, Skribek H, Kis LL, Gloghini A, Markasz L, Flaberg E, Eksborg S, **Kónya J**, Gergely L, Carbone A, Szekely L
Drug sensitivity patterns of HHV8 carrying body cavity lymphoma cell lines
BMC CANCER 11: Paper 441. 11 p. (2011)
IF: 3.011
- Gyöngyösi E, Szalmás A, Ferenczi A, **Kónya J**, Gergely L, Veress G
Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes
VIROLOGY JOURNAL 9: Paper 36. 12 p. (2012)
IF: 2.092
- László B, **Kónya J**, Dandár E, Deák J, Farkas Á, Gray J, Grósz G, Iturriza-Gomara M, Jakab F, Juhász Á, Kisfali P, Kovács J, Lengyel Gy, Martella V, Melegh B, Mészáros J, Molnár P, Nyúl Z, Papp H, Pátri L, Puskás E, Sántha I, Schneider F, Szomor K, Tóth A, Tóth E, Szűcs Gy, Bányai K
Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains
JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 55:(2) pp. 140-146. (2012)
IF: 3.287
- Ferenczi A, Gyongyosi E, Szalmas A, Hernadi Z, Toth Z, **Kónya J**, Veress G
Sequence variation of human papillomavirus Type 31 long control region: Phylogenetic and functional implications
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 85:(5) pp. 852-859. (2013)
IF: 2.217
- Kovacs R, Czudar A, Horvath L, Szakacs L, Majoros L, **Kónya J**
Serum interleukin-6 levels in murine models of *Candida albicans* infection.
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 61:(1) pp. 61-69. (2014)
IF: 0.778

Otvos R, Juhasz A, Szalai E, Ujvari D, Otvos K, Szabo K, Remenyik E, Szekely L, Gergely L, **Kónya J**
Molecular typing of human herpesvirus 8 isolates from patients with Kaposi's sarcoma in Hungary.
ANTICANCER RESEARCH 34:(2) pp. 893-898. (2014)
IF: 1.826

Paholcsek Melinda, Fidler Gabor, **Kónya József**, Rejto Laszlo, Mehes Gabor, Bukta Evelin, Loeffler Juergen,
Biro Sandor
Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis
in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia
BMC INFECTIOUS DISEASES 15: Paper 251. 10 p. (2015)
IF: 2.613*

Gyongyosi E, Szalmas A, Ferenczi A, Poliska S, **Kónya J**, Veress G
Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16
oncoproteins.
ARCHIVES OF VIROLOGY 160:(2) pp. 389-398. (2015)
IF: 2.390*

Scientometria

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	80	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	60	735	906
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	---	3	7	7
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	---	16	12	16
rövid közlemény	---	1	2	4
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	1	---	---
III. Könyvrészlet	11	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	5	6
magyar nyelvű	---	2	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	8	0	0
IV. Konferenciaközlemény³	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)		9	0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)⁴	92	---	761	939

Összesített impakt faktor⁴	147,2	---	---	---
Idézettség száma^{1,4}	---	---	761	939
Hirsch index¹	17	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma	7
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma	16
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktor összege	58,6
Az utolsó tudományos fokozat/cím (PhD) elnyerése utáni (1998 -) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	72
impakt faktor összege	131,9
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	16
Az utolsó 10 év (2005-2015) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	52
impakt faktor összeg	83,2
idézettség száma	444
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	94 (10,01%)
WOS/Scopus azonosítóval idézettség	706
Sokszerzős és/vagy csoportos közlemények impakt faktor összege	0
idézettsége	0
Folyóiratcikkek, 15-29 szerzővel	4

¹ disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül, ² lektorált, tudományos folyóiratban, ³ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben, ⁴ a sokszerzős és/vagy csoportos szerzőségű közlemények adatai nélkül