A humán cytomegalovirus transplacentaris terjedésében szerepet játszó tényezők

Ph.D. Thesis

Kovács Ida Jusztina

Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2008

A várandós anyák primer és rekurrens humán cytomegalovirus (HCMV) fertőzéséhez társulhat a magzat fertőzése. A HCMV a congenitalis vírusfertőzések leggyakoribb okozója, amelynek legsúlyosabb következménye a szellemi visszamaradottság, progrediáló halláskárosodás, látászavarok. A fertőzés az újszülöttek 1-4%-át érinti az USA-ban és Európában, a fejlődő országokban gyakoribb. A fogékony terhesek 0,3-3,7%-a fertőződik HCMV-vel és a fertőzések 95%-a tünetmentes. Az esetek 20-50%-ában a magzat is fertőződik. A várandós anya primer HCMV fertőzése kapcsán fertőződött magzatok 10-15%-ában már születéskor észlelhetők a különböző súlyosságú klinikai tünetek, 10-15%-ában csak később, esetleg évek múlva jelentkezik a progrediáló halláskárosodás vagy a mentális retardáció. A prekoncepcionálisan HCMV szeropozitív terhesek magzatai is fertőződhetnek, az esetek 0,15-2,4%-ában. Valószínű, hogy ilyenkor a latensen perzisztáló HCMV reaktiválódik, de a reinfekció sem zárható ki. A magzat fertőződése a terhesség bármely szakaszában bekövetkezhet. Az első trimeszterben fertőződött magzatokban nagyobb gyakorisággal (32%) látható súlyos klinikai elváltozás, mint a terhesség későbbi időszakában (15%).

A magzat HCMV fertőzése, néhány esettől eltekintve, az anya vérében lévő vírus transzplacentaris terjedésének következménye. A chorionbolyhok stromájában lévő macrophagokban, fibroblastokban és endothelsejtekben kimutatták a HCMV-t függetlenül attól, hogy bekövetkezett-e a magzat fertőződése vagy nem. Ez arra utal, hogy a

placenta a HCMV transzplacentaris terjedésének igen hatásos funkcionális barrierje.

Ismert, hogy a HCMV törzsek genetikailag különbözőek és ez megnyilvánulhat tropizmusukban és virulenciájukban. Továbbá az is, hogy a laboratóriumi törzsek a sorozatos passzázs során elvesztik számos génjüket.

Nagyon valószínű, hogy a HCMV fertőzés anyáról magzatra terjedése számos tényezőtől függ. HCMV izolátumokkal végzett vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a placentában milyen reguláló mechanizmusok működésének következménye a magzat fertőzése.

1. A HCMV vertikális terjedésével kapcsolatos vizsgálataink során tanulmányoztuk syncytiotrophoblastok (ST-ok) HCMV izolátumokkal szembeni fogékonyságát és ennek molekuláris hátterét, különös tekintettel a gyulladásos cytokinek szerepére. Kísérleteinkben egyedi, első trimeszterből származó placenta cytotrophoblastjainak (CT) differenciáltatásával nyert ST tenyészeteket fertőztünk különböző HCMV izolátumokkal és laboratóriumi törzzsel. Az *in vivo* viszonyokhoz hasonló körülményeket utánozva a fertőzés multiplicitása (MOI) alacsony (0,1) volt. A tenyészetek tápfolyadékában meghatároztuk a képződött tumornecrosis-faktor α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) és interleukin-8 (IL-8) mennyiségét. Vizsgáltuk a cytokinek mennyisége és az igen korai (IE) HCMV gén kifejeződésének gyakorisága közötti kapcsolatot.

A cytokinek (TNF-α, IL-1β, IL-6 és IL-8) mennyiségét ELISA tesztekkel határoztuk meg és a vírus igen korai géntermékét, az IE antigént immunfluoreszcens módszerrel mutattuk ki.

Eredményeink szerint sem a kontroll, sem az egyes HCMV törzzsel, azonos multiplicitással fertőzött ST tenyészetek tápfolyadékában TNF-α és IL-1β nem volt kimutatható mennyiségben. IL-6-ot mind a kontroll tenyészet, mind a laboratóriumi törzzsel és a legtöbb izolátummal fertőzött tenyészet tápfolyadékában hasonló szintben találtunk. Az IL-8 termelés a HCMV izolátumokkal fertőzött ST tenyészetekben különböző mértékű volt. A 128V és a 20 jelű izolátumok hatására az ST tenyészetekben jelentősen nagyobb mennyiségű IL-8 képződött. Az IL-8 mennyiségétől függött a vírus IE génjét expresszáló sejtek száma.

2. Ismerve, hogy az IL-8 számos sejtféleségben dózistól függően fokozza a laboratóriumi HCMV törzsek szaporodását, valószínű, hogy az izolátumok IL-8-at indukáló képessége összefügg szaporodásuk mértékével a ST-okban és egyéb epithelsejtekben. Feltételezésünk alátámasztására vizsgáltuk az A549 sejtben HCMV izolátumok IL-8-at indukáló képessége és a fertőzés kimenetele közötti összefüggést. Meghatároztuk a képződött IL-8 mennyisége, az IE gén kifejeződésének gyakorisága és az infektív vírushozam közötti kapcsolatot. Továbbá vizsgáltuk, hogyan befolyásolja az exogén IL-8 a különböző IL-8 indukáló képességgel rendelkező HCMV izolátumok IE génkifejeződését.

Vizsgálatainkhoz HCMV izolátumokat, valamint laboratóriumi törzseket használtunk, a MOI alacsony (0,1) volt. A fertőzött sejtekben

képződött IL-8 mennyiségét ELISA teszttel határoztuk meg, az IE antigént immunfluoreszcens módszerrel mutattuk ki és a vírus mennyiségét MRC-5 sejtekben plakk módszerrel határoztuk meg.

A HCMV izolátumok IL-8-at indukáló képessége különböző volt az A549 sejtekben is. Az IL-8 mennyiségét a kontroll tenyészet, a laboratóriumi törzzsekkel fertőzött tenyészetek és egyes izolátummal fertőzött tenyészetek tápfolyadékában alacsonynak találtunk. A 128V jelű izolátum lényegesen nagyobb mennyiségű IL-8-termelést indukált, mint a többi. A HCMV fertőzött sejtekben az IE gén kifejeződésének mértéke összefüggést mutatott a képződött IL-8 mennyiségével. Az E5 jelű izolátummal fertőzött tenyészetben 3-szor, míg a 128V jelű izolátummal fertőzöttben 7-szer több IE géntermékет tartalmazó sejt volt, mint a laboratóriumi törzsekkel fertőzött tenyészetekben. A 128V jelű izolátummal fertőzött A549 tenyészetekben 10 000–szer nagyobb volt a vírushozam, mint az E5 jelű izolátummal fertőzöttben. A Towne laboratóriumi törzzsel fertőzött tenyészetekben infektív vírust nem mutattunk ki a vizsgálat ideje alatt. Az exogén IL-8 az alkalmazott dózistól (0,1-10 pg/ml) függően növelte az IE antigént kifejező sejtek számát a különböző IL-8-at indukáló HCMV törzsekkel fertőzött A549 sejtekben.

Megállapítható, hogy az egyes HCMV izolátummal fertőzött A549 sejtekben a képződött IL-8 mennyisége összefügg a vírus IE génjét expresszáló sejtek számával és a vírushozammal.

Mind az ST, mind az A549 sejtekben végzett vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy bizonyos HCMV gén(ek) variabilitásával

függ össze a vírus permisszívitása epithelsejtekben. Ezek egyike lehet az UL146 gén, amely az IL-8-al megegyező kemokint kódol.

3. Tanulmányoztuk, hogy van-e kapcsolat a HCMV izolátumok UL55, UL146 és UL139 hipervariabilis génjeinek polimorfizmusa és az ST, továbbá az A549 tenyészetekben képződött IL-8 mennyisége között.

A target DNS amplifikációja polimeráz láncreakció (PCR)-val vagy nested PCR-el történt. Az amplifikált termékeket agaróz gél elektroforézissel mutattuk ki. Az UL55 genotípus meghatározásához restrikciós enzimanalízist, az UL146 és UL139 genotípus meghatározásához az amplifikált termékek szekvenálását és szekvencia elemzését végeztük el. Néhány esetben, ahol a közvetlen szekvenálás nem adott értékelhető eredményt vagy több genotípus jelenlétére utalt, az ismételt szekvenciaelemzést a fragmentek klónozása előzte meg.

Harmincegy HCMV izolátum genotípusát határoztuk meg, amelyből 7 anya-magzat pár volt. A 31 HCMV törzs négy UL55 genotípus (gB1-gB4), kilenc UL146 (G1-2 és G7-13) genotípus és hét UL139 genotípus (G1-7) tagja. Az anyák és újszülötteikből származó izolátumok genotipizálásának eredményei azt mutatják, hogy nem változik a HCMV törzsek UL55, UL146 és UL139 genotípusa az anyából a transplacentaris magzatba jutás során. Egy újszülöttől származó izolátumban (E24) két UL55 (gB1 és gB2) két UL139 (G4 és G7) és egy UL146 (G9) genotípust mutattunk ki, ami arra utal, hogy az újszülött két különböző HCMV-val fertőzödött. Egy congenitalisan fertőzött újszülöttben változatlan maradt a

vírus gB (gB1), UL146 (G11) és UL139 (G2) genotípusa a minták (16/3 és 16/5) vétele között eltelt 17 hónap alatt.

Nem találtunk összefüggést sem az UL55 sem az UL 139 genotípusok és az IL-8-at indukáló képességük között. Az eredmények azonban nem zárják ki feltételezésünket, mely szerint az UL146 gén polimorfizmusával összefügg a HCMV törzsek IL-8 termelést indukáló képessége. Ennek igazolásához további izolátumok genotipizálása, IL-8 termelést indukáló képességük és permisszívitásuk közötti kapcsolatok vizsgálata szükséges.

Eredményeink szerint, a HCMV izolátumokkal fertőzött ST és A549 tenyészetekben a képződött IL-8 mennyiségétől függ a vírushozam. Valószínű, hogy a HCMV törzsek endogén IL-8 mennyiségétől függő szaporodásának mértéke összefügg a HCMV bizonyos gén(ek) polimorfizmusával. Különösen figyelmet érdemel az UL146 gén, amely IL-8 virokint kódol. A HCMV törzsek UL146 gén polimorfizmusa, valamint az egyéb eredetű, így fertőző agensek indukálta un. exogén IL-8 szerepet játszhat a HCMV fertőzés transplacentaris terjedésében és magyarázatul szolgálhat a várandós anyák HCMV fertőzésével kapcsolatos magzati fertőzések gyakoriságára. A HCMV IL-8-al összefüggő transplacentaris terjedése alapul szolgálhat új típusú, a folyamat gátlásával összefüggő terápia kifejlesztéséhez.