

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

Diplomová práce

HCMV v nádorech dětského věku

Šárka Varcabová

Praha 2007

Vedoucí diplomové práce:
Prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole
Klinika dětské hematologie a onkologie

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních pramenů a pod vedením uvedeného vedoucího diplomové práce.

Praha, červenec 2007

Šárka Varcabová *Šárka Varcabová*

Diplomová práce byla zpracována v rámci výzkumných záměrů MŠMT grant číslo: 0021620813.

Děkuji Prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady a pomoc při řešení zadaných úkolů.
Děkuji také svým rodičům za podporu během studia.

OBSAH

1. Seznam zkratk	6
2. Úvod	8
3. Přehled literatury	10
3.1. Viry obecně	10
3.1.1. Definice virů	10
3.1.2. Původ virů	10
3.1.3. Stavba viru	11
3.1.4. Životní cyklus virů	13
3.1.5. Onkogenní viry	13
3.1.5.1. Hepadnaviridae	14
3.1.5.2. Flaviviridae	15
3.1.5.3. Retroviridae	15
3.1.5.4. Papovaviridae	16
3.1.5.5. Papillomaviridae	16
3.1.5.6. Herpesviridae	17
3.1.5.7. Adenoviridae	18
3.1.6. Viry ovlivňující vlastnosti nádorů	21
3.2. Lidský cytomegalovirus (HCMV)	22
3.2.1. Zařazení HCMV do systému	22
3.2.2. Historie viru	23
3.2.3. Morfologie viru	23
3.2.4. Genom viru	24
3.2.5. Infekce lidským cytomegalovirem	25
3.2.6. Onkogenní potenciál HCMV	26
3.2.7. Onkomodulace buněk HCMV	28
3.2.7.1. Ovlivnění programované buněčné smrti (apoptózy) ..	28
3.2.7.2. Modulace buněčné migrace	29
3.2.7.3. Modulace angiogeneze	30
3.2.7.4. Modulace signálních drah a produkce transkripčních faktorů	30
3.3. Detekce HCMV pomocí real – time PCR	32
3.4. Nádory dětského věku	35
3.4.1. Neuroblastom	36

3.4.2. Ewingův sarkom	37
3.4.3. Sarkomy měkkých tkání	37
3.4.4. Hodgkinův lymfom	37
3.4.5. Non – Hodgkinův lymfom	38
3.4.6. Nádory centrální nervové soustavy	38
3.4.7. Germinální nádor	39
3.4.8. Nefroblastom	39
4. Materiály a metody	41
4.1. Přehled použitých přístrojů	41
4.2. Biologický materiál	41
4.3. Izolace buněčné a virové DNA	41
4.3.1. První den	41
4.3.2. Druhý den	42
4.3.3. Třetí den	42
4.4. Kontrola čistoty izolované DNA	42
4.5. Stanovení citlivosti detekce HCMV pomocí real – time PCR	43
4.6. Detekce virové DNA pomocí real – time PCR	43
4.7. Statistické zpracování výsledků	45
5. Výsledky	46
5.1. Citlivost metody	46
5.2. Vyšetřené vzorky	47
6. Diskuze	52
7. Závěr	55
8. Použitá literatura	56

1. SEZNAM ZKRATEK

ASTR I.	astrocytom grade I.
ASTR II.	astrocytom grade II.
ASTR III.	astrocytom grade III.
BA	benigní afekce
CNS	centrální nervová soustava
CR	kompletní remise onemocnění
DD	pacient zemřel na onemocnění
EBNA2	nukleární protein 2
EW	Ewingův sarkom
GIST	gastrointestinální stromální nádor
GN	germinální nádor
HBV	virus hepatitidy B
HHV8	herpetický virus 8
HCC	hepatocelulární karcinom
HCMV	lidský cytomegalovirus
HTLV	virus lidské leukémie dospělých
HODG	Hodgkinův lymfom
HR NBL	vysoce rizikový neuroblastom
IL-2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6
KD	kostní dřev
KSHV	virus Kaposiho sarkomu
LMP1	latentní membránový protein 1
LR NBL	nízce rizikový neuroblastom
MR NBL	středně rizikový neuroblastom
NFR	nefroblastom
NFκB	nukleární faktor kappa B
NHL	Non-Hodgkinův lymfom
Tax 1	transaktivační fosfoprotein X 1
Tax 2	transaktivační fosfoprotein X 2
TNF – α	tumor necrosis faktor α

PD	progrese onemocnění
PK	periferní krev
PR	parciální remise onemocnění
RMS	rhabdomyosarkom
SD	stabilizovaný stav onemocnění
SV40	Simian virus 40
Tu	nádorová tkáň
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR	receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru
VGPR	velmi dobrá parciální remise

2. ÚVOD

Otázka souvislosti vzniku některých nádorů s infekcí určitým virem je už bezmála sto let stará. Nicméně až během posledních let se tato problematika dostala do popředí vědeckého zájmu. V dnešní době už má téměř každá významnější skupina virů svého onkogenního zástupce. Společných rysů, kterými by se tyto viry daly charakterizovat, není mnoho. Mechanismy, kterými působí na vnitřní prostředí buňky a navozují nádorovou transformaci, se liší vir od viru. Společné je jim pouze to, že jsou v populaci velmi rozšířené, způsobují dlouhodobé infekce, ale pouze u malého zlomku osob mají na svědomí nádorové onemocnění. Je jasné, že samotná přítomnost viru v buňce nepodmiňuje nádorovou přeměnu. Vliv má na celý proces obrovské množství faktorů, jako je např. rozsah virové replikace, délka jejího trvání, typ infikované tkáně a obranyschopnost hostitele. Dlouhá doba, po kterou přežívají v organismu, také dává možnost vzniku mutantních virů, které mohou mít větší onkogenní potenciál. Obecně je mechanismus transformace infikované buňky v nádorovou velice komplexní a zatím ještě velmi málo probádaný.

Kromě skupiny virů, u kterých byly onkogenní vlastnosti prokázány, existují také viry, které transformaci přímo nevyvolávají, a to ani dlouhodobou infekcí, ale přesto se pravděpodobně na vzniku a rozvoji nádorového onemocnění nepřímou podílejí. Takovým virem je také lidský cytomegalovirus (HCMV) patřící do skupiny Herpesviridae, odkud je známo několik onkogenních zástupců. Tento virus bývá často nalézán v nádorových buňkách nádorů různého typu a jsou některé důkazy, že svou přítomností pozměňuje vnitřní prostředí, což se může projevit změnou biologického chování těchto buněk a tedy i nádoru.

Tím, že životní cyklus HCMV narušuje a různě upravuje základní regulační a transkripční mechanismy v buňce, ať již záměrně nebo náhodně, sice přímou nádorovou transformaci nezpůsobuje, ale může výrazně ovlivňovat regulaci apoptózy, migrační schopnosti buněk, stimulovat angiogenezi a ovlivňovat signální dráhy a produkci různých transkripčních faktorů. Všechny tyto mechanismy jsou zcela zásadní pro rozvoj a agresivitu nádorového onemocnění, takže v některých případech může hrát infekce HCMV v nádorové tkáni významnou roli.

Cíle diplomové práce:

- 1) Zjistit výskyt HCMV infekce v nádorech dětského věku.
- 2) Zjistit, zda infekce tímto virem ovlivňuje chování některých nádorů dětského věku.

3. PŘEHLED LITERATURY

3.1. Viry obecně

3.1.1. Definice virů

Velmi složitou otázkou, kterou se zabývá moderní mikrobiologie, je definice virů a jejich následné zařazení do systému.

Už samotná otázka, zda je virus organismus, je složitá. Jedna z definic živého organismu zní: „Organismus je z dílčích prvků složená, vůči okolí zřetelně ohraničená, strukturně a funkčně integrovaná, nukleovou kyselinu obsahující jednotka, která autonomně kontroluje svoji vlastní reprodukci a nezávisle reaguje na evoluční síly.“ (Kaprálek 2000). Podle této definice je zřejmé, že se virus dá zařadit mezi organismy.

Nicméně se virus nedá považovat za buňku, jelikož obsahuje na rozdíl od všech buněčných organismů pouze jeden druh nukleové kyseliny, není schopen růstu ani dělení, nemá vlastní proteosyntetický ani metabolický aparát. Aby se mohl množit, musí využívat jednotlivé nástroje metabolismu i proteosyntetického aparátu svého hostitele (rostlinné, živočišné nebo bakteriální buňky). Je tedy parazitem na genetické úrovni.

Jak tedy lze definovat virus: „Je to diskrétní jednotka živé hmoty, která obsahuje nukleovou kyselinu jako nositele své genetické informace, a která je schopná autoreprodukce a evoluce.“ (Kaprálek 2000).

3.1.2. Původ virů

Pravděpodobný původ virů lze odvodit z jejich vzhledu a základní životní strategie. Jedná se o kódující sekvenci nukleové kyseliny obsahující tři až několik set genů, která je obalena proteinovým obalem. Vzhledem k tomu, že i ty nejsložitější viry nejsou schopny se samy replikovat a musí využívat hostitelského genetického a metabolického aparátu, je zřejmé, že se musely na Zemi objevit až po vzniku buněčných organismů.

Jejich předchůdci mohly být malé úseky DNA, které získaly schopnost replikovat se nezávisle na chromosomech hostitelské buňky. Posléze nabyly i schopnost obalit se ochranným obalem - kapsidou, uvolňovat se z hostitelské

buňky a pronikat do buněk okolních. Jejich nejbližšími příbuznými se tedy jeví být transpozony a plasmidy, které však na rozdíl od nich nejsou schopny tvořit kapsidy a nezávisle se pohybovat z buňky do buňky. Vzhledem k tomu, že se pokládá za dosti pravděpodobné, že RNA organismy předcházely DNA organismům, nejpravděpodobnějšími předchůdci virů jsou tedy RNA - plasmidy, které získaly gen pro syntézu kapsidového proteinu (Alberts et al. 1998).

3.1.3. Stavba viru

Jak již bylo výše uvedeno, virus se skládá z nukleové kyseliny a bílkovinného obalu. Podle typu nukleové kyseliny je možno rozdělit viry na: RNA viry a DNA viry. Avšak vzhledem k tomu, že je mnohem podstatnější způsob, jakým je nukleová kyselina replikována, než o jaký typ se jedná, je mnohem přesnější rozdělení podle způsobu replikace na:

- viry syntetizující RNA podle RNA: k replikaci dochází pomocí virové RNA polymerázy, kterou virus kóduje (např. čeleď Paramyxoviridae)
- střídání syntézy RNA podle DNA a naopak: tyto viry během svého cyklu přepisují svou genetickou informaci z jedné formy nukleové kyseliny do druhé a jejich infekční virová partikule může obsahovat buď DNA (např. čeledi Hepadnaviridae a Caulimoviridae), nebo RNA (Retroviridae)
- viry syntetizující DNA podle DNA: některé viry k tomu využívají vlastní virovou DNA polymerázu, jiné hostitelskou (např. čeleď Herpesviridae)

První skupina virů je pravděpodobně nejstarší. Vzhledem k tomu, že obsahuje pouze jedno vlákno RNA ze dvou možných, rozlišujeme tyto viry na RNA pozitivní a RNA negativní v závislosti na tom, jestli může být infekční RNA rovnou využita pro překlad jako mRNA (pozitivní RNA viry – Picornaviridae, Caliciviridae a další), nebo nejprve využita pro nasyntetizování opačného řetězce (negativní RNA viry – Rhabdoviridae, Bunyaviridae).

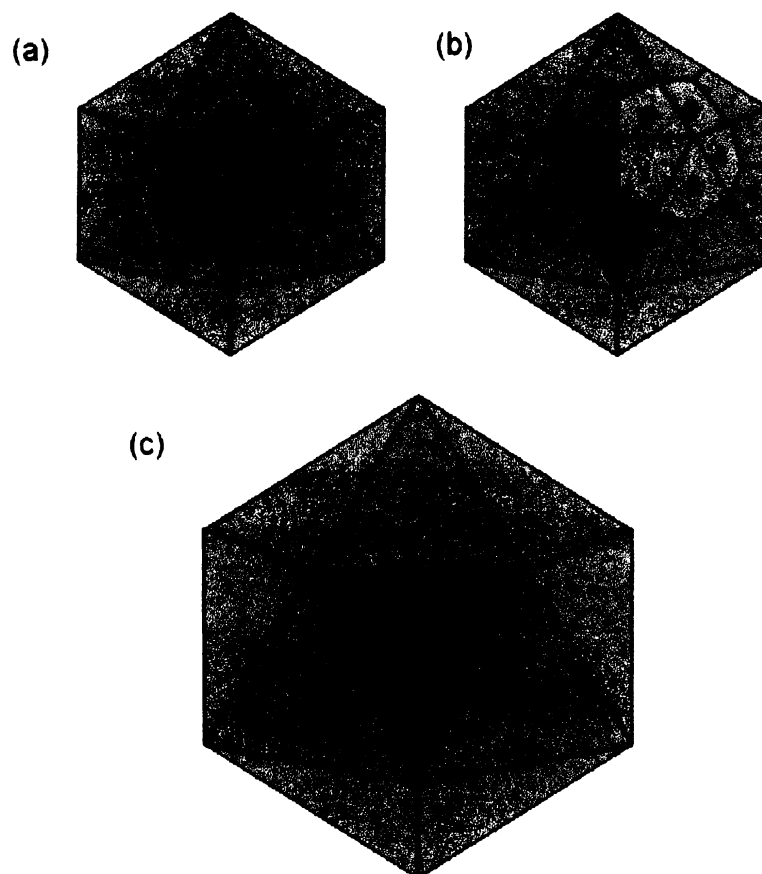
Z hlediska evoluce je velmi zajímavá druhá skupina virů. Pravděpodobně zaznamenává evoluční most mezi RNA světem a DNA světem. Enzym reverzní transkriptáza, který umožňuje těmto virům přepis z RNA do DNA, je pravděpodobně evolučně nejstarší známou DNA polymerázou (Závada 1999).

Poslední skupina zahrnuje už vývojově pokročilejší viry, které plně využívají výhod zachování genetické informace pomocí DNA (vyšší stabilita, větší odolnost

vůči mutagenním faktorům a opravné mechanismy). Díky větší stabilitě může virový genom nabývat na délce a složitosti, což umožňuje sofistikovanější životní strategie (Závada 1999).

Bílkovinný obal neboli kapsida se skládá z podjednotek jednoho nebo více proteinů, které jsou kódovány virovým genomem a které se uspořádávají do pravidelné mozaikovitě struktury. Nejčastější formou prostorového uspořádání kapsidy je icosahedron, což je sférický pravidelný dvacetistěn, jehož jednotlivé stěny mají tvar rovnostranných trojúhelníků.

Druhou nejčastější formou je spirála, která kopíruje tvar nukleové kyseliny virového genomu. Případně mohou být obě formy kombinovány v podobě icosahedronu jakožto hlavičky viru a helixu jako ocásku, kudy prochází nukleová kyselina membránou hostitelské buňky (Závada 1999).



(obr. 1) Icosahedrální kapsida

(zdroj: web-books.com/MoBio/Free/Ch1E1.htm)

3.1.4. Životní cyklus virů

Základním životním cyklem virů je tzv. lytický cyklus. Ačkoliv u jednotlivých druhů virů nabývá různých variant, lze ho shrnout do několika základních fází:

Adsorpce: neboli navázání virové částice na povrch hostitelské buňky. Na základě interakce specifických receptorů na povrchu viru a buňky je zajištěno navázání na správného hostitele (většina virů je velmi specializovaná a infikuje pouze některé typy buněk, nebo pouze některé skupiny živočichů, rostlin či bakterií, případně se specializuje pouze na jeden druh).

Penetrace: neboli vniknutí virové nukleové kyseliny do hostitelské buňky přes plasmatickou membránu.

Replikace: zahrnuje zmnožení virového genomu pomocí hostitelského replikačního aparátu a transkripci virové mRNA pomocí transkripčního hostitelského aparátu.

Skládání: uspořádání jednotlivých kopií virového genomu a nasyntetizovaných kapsidových proteinů do jednotlivých infekčních částic.

Uvolnění: nové virové částice upouštějí původní hostitelskou buňku. Uvolněné virové částice napadají nové hostitelské buňky. Většinou je toto opuštění natolik drastické, že hostitelská buňka vzápětí hyne (Lodish 2004).

Avšak ne všechny viry po vniknutí do hostitelské buňky vstupují do lytického cyklu, který vede k pomnožení a šíření. Některé vývojově pokročilejší viry jsou schopny navodit tzv. lyzogenní cyklus, který spočívá v integraci virového genomu do genomu hostitele a v replikaci společně s replikací hostitelského genomu. Tyto viry pak mohou přežívat v této pasivní formě po velmi dlouhou dobu, dokud se po nějakém stimulu neaktivují. Aktivovaný virus se vyštěpí z hostitelského genomu a zahájí lytický cyklus.

3.1.5. Onkogenní viry:

Již v roce 1911 byla publikována práce Peylona Rouse o vzniku maligního onemocnění kuřat vlivem virové infekce (Rousův sarkom). Poznatku o možném onkogenním potenciálu některých virů však nebyl po dlouhou dobu přikládán dostatečný význam. Teprve během posledních dvaceti let se začaly objevovat práce dokazující účast některých infekčních agens, nejčastěji virů, ale i parazitů a bakterie *Helicobacter pylori*, na vzniku lidských nádorů. Dnes je již známo velké množství

skupin virů, jejichž dlouhotrvající infekci v organismu lze spojit s vývojem maligního onemocnění (Kolářová et al. 2000). Na vzniku nádorů se podílejí jak některé RNA viry tak i DNA viry.

Obecně lze říci, že všechny nádorové lidské viry infikují hostitele dlouhodobě. K vývoji nádorového onemocnění dochází až po velmi dlouhé době, např. při chronické infekci hepatocytů virem hepatitidy B se vyvine hepatocelulární karcinom (HCC) až po třiceti až čtyřiceti letech a to pouze u některých pacientů (Kolářová 2000). Vznik onemocnění tedy není infekcí onkogenním virem vyvolán vždy. Většinou je zapotřebí ještě dalších faktorů jako je třeba snížená imunita. Dlouhodobá infekce také poskytuje viru mnoho času, aby se sám vyvíjel a vlivem náhodných mutací tak získal větší onkogenní potenciál.

Mezi nejznámější a nejprostudovanější skupiny virů obsahujících onkogenní zástupce patří: Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Papovaviridae, Papillomaviridae, Herpesviridae, Adenoviridae.

3.1.5.1. Hepadnaviridae:

Hepadnaviry jsou skupina dsDNA virů s extrémně malým genomem (kolem 3,2 kbp), které ve svém životním cyklu zahrnují transkripci i reverzní transkripci. Vzhledem k tomu, že se replikují v buňkách jaterního parenchymu, bylo jejich podrobné studium do nedávné doby velice obtížné. Hepatocyty se totiž pěstují in vitro velice obtížně.

Virus hepatitidy B (HBV):

Nejznámějším a zároveň z hlediska onkogenního účinku nejprostudovanějším je virus hepatitidy B (HBV). Přímý transformační vliv HBV na jaterní buňky nebyl dokázán a má se za to, že HBV ovlivňuje vznik maligního nádoru nepřímo. Díky imunitní odpovědi nemocného proti infikovaným buňkám dochází k velkému úbytku hepatocytů, a proto je jejich množství stále doplňováno. Zvýšená frekvence dělení neinfikovaných hepatocytů pak zvyšuje riziko vzniku spontánní mutace, která může dát základ monoklonálnímu nádoru, ve většině případů hepatocelulárnímu karcinomu (Baffis et al. 1999, Liang et al. 2000). Důkazem toho, že nádor vzniká z jediné buňky je fakt, že ve všech buňkách nádoru je virový genom integrován ve stejném místě, ačkoliv k jeho vložení nedochází místně specificky (Závada 1999).

3.1.5.2. *Flaviviridae*:

Flaviviridae jsou skupinou pozitivních obalených RNA virů. Nejpočetnějším je rod Flavivirus, který tvoří asi 70 příbuzných virů. Mezi nejznámější zástupce této skupiny patří virus klíšťové encefalitidy, virus žluté zimnice a virus horečky Dengue.

Virus hepatitidy C:

Onkogenním zástupcem této skupiny je virus hepatitidy C. Je původcem akutní hepatitidy a po období akutní infekce je až u 90 % infikovaných postiženo chronickou hepatidou. Díky dlouhotrvající infekci se během 20 - 30 let vyvine u 2 – 7 % pacientů hepatocelulární karcinom (HCC) (Koutecký et al. 2004). Způsob jakým ovlivňuje buněčné děje a navozuje změnu normální buňky v nádorovou je velmi podobný jako u mnohem známějšího viru hepatitidy B (Baffis et al. 1999, Liang et al. 2000).

3.1.5.3. *Retroviridae*:

Tato skupina obsahuje hned několik onkogenních virů. Nejznámějším zástupcem této skupiny je bezpochyby virus HIV. U lidí napadených tímto virem vznikají mnohem častěji Kaposiho sarkomy a Non-Hodgkinovy lymfomy, nicméně vznikají spíše z důvodů kolapsu imunitního systému než díky přímému transformačnímu vlivu tohoto viru (zur Hausen 2001).

Virus lidské leukémie dospělých (HTLV-I):

Dalším retrovirem s onkogenním potenciálem je virus lidské leukémie dospělých (HTLV-I) (Gallo 1985). Tento virus byl objeven v roce 1978 během výzkumu nápadně často se vyskytujících T-leukémií a T-lymfomů dospělých lidí v jihozápadním Japonsku. Schopnost vyvolat nádorové onemocnění spočívá v úloze virového genu tax, jehož produkt, protein Tax1 (transaktivační fosfoprotein X 1), je modulátorem transkripce (Yasunaga a Matsuoka 2007). Jak bylo zjištěno, všechny infikované T-lymfocyty vykazují fenotyp aktivovaných CD4+ T-lymfocytů, které exprimují některé antigeny, které by normální CD4+ T-lymfocyt expimoval jen po aktivaci. Mimo jiné se jedná o expresi alfa podjednotky interleukinu 2 (IL-2) a

a receptoru pro IL-2 (CD25), což je růstový faktor T-lymfocytů (Koutecký et al. 2004). Kromě toho aktivuje některé transkripční faktory, např. NFkB a ATF/CREB (Kibler et al. 2001) a geny pro některé lymfokiny. Množství nakažených lidí tímto virem značně geograficky kolísá. Nejpostiženějšími jsou oblasti Japonska a Karibských ostrovů, kde nakažení představují kolem 30 % obyvatelstva. Z nich v důsledku dlouhodobé infekce virem onemocní leukémií asi 0,1 % (Závada 1999). U nás se tento virus vyskytuje velmi vzácně a tyto formy leukemií a lymfomu u nás proto prakticky nejsou.

HTLV-II:

Méně prostudovaným blízkým příbuzným viru HTLV-I je virus HTLV-II, u nějž se předpokládá, že by se také mohl podílet na vzniku leukémie. Nicméně pravděpodobně s mnohem menší účinností, protože jeho transaktivační protein Tax2 vykazuje menší transformační aktivitu než Tax1 viru HTLV-I (Endo et al. 2002).

3.1.5.4.Papovaviridae:

Do této skupiny patří viry s nejlépe prostudovaným onkogenním účinkem. Jedná se o skupinu malých neobalených dsDNA virů. Díky těmto vlastnostem mohly být jejich molekulární pochody snadno studovány.

Virus SV40:

Jedním ze známých onkogenních virů je virus SV40. Některé jeho proteiny mají enzymatickou aktivitu, která přímo interaguje s DNA hostitele a blokuje transkripci antionkogenů, jako je například p53 nebo pRb (Sáenz-Robles et al. 2001). Tím vyvádí buněčné prostředí z rovnováhy a oslabuje kontrolu buněčného dělení. Dnes se předpokládá, že tento virus se podílí na vzniku některých lidských mozkových nádorů a mezotelionu (Vilchez a Butel 2004).

3.1.5.5.Papillomaviridae:

Dalšími onkogenními viry je skupina lidských papillomavirů. Prokázán byl vztah mezi některými kmeny těchto virů a vznikem karcinomu děložního čípku. Předpokládá se, že se mohou účastnit i vzniku dalších nádorů převážně anogenitální

oblasti. Mechanismus zhoubného účinku na buňku v případě karcinomu děložního čípku souvisí s dvěma ranými virovými proteiny E6 (Ishiji et al. 1992) a E7 (Ishiji et al. 1992, Donà et al. 2007). Tyto proteiny jsou schopny imortalizovat buňku, především interakcí s antionkogenními proteiny.

E6 se váže na p53 a prostřednictvím ubiquitinové dráhy ho odstraňuje. Dále také stimuluje telomerázu, která ochraňuje konce hostitelských chromozómů před degradací, a tím před předčasnou smrtí buňky. E6 navíc zvyšuje expresi VEGF, což je růstový faktor, který podporuje angiogenezi. Protein E7 se podílí na imortalizaci buňky interakcí s produktem antionkogenu, v tomto případě s pRb. Jeho navázáním se uvolní transkripční faktory, které spustí nekoordinovanou syntézu proteinů pro buněčný růst. Oba tyto virové proteiny mají mimo to velmi důležitou roli v replikačním cyklu viru. Pokud jejich funkci již virus nepotřebuje, tlumí jejich expresi jiným svým raným proteinem E2 (Cripe et al. 1987). Problém pro hostitele nastává, když se virus začlení do hostitelského genomu. Aby tak mohl učinit, nejprve rozštěpí virovou DNA kružnici, a to nejčastěji právě v oblasti kódující protein E2. Virové onkogenní proteiny E6 a E7 jsou tak nekontrolovatelně exprimovány, což může po čase způsobit vznik karcinomu (Koutecký et al. 2004). V současné době jsou připraveny a schváleny vakcíny proti onkogenním kmenům HPV. Po očkování bylo již prokázáno snížení výskytu karcinomu čípku. Tyto vakcíny se nyní zavádí do praxe.

3.1.5.6. Herpesviridae:

Onkogenní zástupci této skupiny virů patří mezi tzv. Gammaherpesvirinae, které napadají převážně lymfatický systém. Nejznámějšími z nich jsou virus Epstein - Barrové (EBV) a lidský herpetický virus 8 (HHV8).

Virus Epstein - Barrové

Patří mezi populační viry a je jím pravděpodobně nakaženo kolem 90 % (Kolářová et al. 2000) populace. Infekce tímto virem je doživotní a zpravidla bezpříznaková. Pouze u mladých lidí může vést k nezhoubnému onemocnění – infekční mononukleóze. Kromě toho, což je mnohem závažnější, je pravděpodobně původcem některých nádorových onemocnění: afrického endemického Burkittova lymfomu, lymfomů u osob se sníženou imunitou nebo nediferencovaného

nazofaryngeálního karcinomu. Pravděpodobně se může podílet i na vzniku Hodgkinovy choroby případně nádorů gastrointestinálního traktu nebo karcinomu prsu.

Mechanismus, jakým tento virus transformuje buňky, není příliš znám, ale pravděpodobně v něm hrají důležitou roli pozdní virové proteiny LMP1 (Wang et al. 1996) a EBNA2 (Wang et al. 1987), které se chovají jako onkogeny. LMP1 je protein, který umožňuje nesmrtelnost B-lymfocytů, případně fibroblastů, a to díky aktivaci transkripčních faktorů. Podobným způsobem navozuje transformaci i protein EBNA2. Na udržení transformovaného stavu se poté podílí další virové proteiny, které buňku chrání před imunitní odpovědí hostitele nebo dokonce interagují s antionkogenním genem pRB (Inman a Farrell 1995). Ke vzniku nádoru je většinou nutný imunodeficitní stav, např. AIDS, imunosuprese po transplantaci nebo vyčerpání imunity při chronické malarii (africký endemický Burkittův lymfom). Při poruše imunity totiž nejsou buňky infikované EBV rozpoznány a následně likvidovány vlastní imunitou (Koutecký et al. 2004).

Virus HHV8

Není v populaci tolik rozšířen jako EBV. Udává se, že v normální populaci je nakaženo kolem 10 % osob. Jeho transformační aktivita se váže ke vzniku Kaposiho sarkomu, proto je tento virus občas nazýván také jako herpetický virus Kaposiho sarkomu. Dále je předpokládán jeho etiologický vztah k dalším nádorovým onemocněním: malignímu lymfomu, méně pravděpodobně k myelomu. Nejsilnější vztah má k prve jmenovanému Kaposiho sarkomu. Byl nalezen v nádorových buňkách v 95 % případech tohoto onemocnění. Způsob, kterým mění infikované buňky v maligní, je asi podobný působení retrovirů. Například virový protein označovaný cyklin D pomocí cyklin dependentní kinázy fosforyluje a inhibuje pRB i produkty některých dalších antionkogenů. Virus kóduje také vlastní IL-6, který podporuje proliferaci B-lymfocytů (Jones et al. 1999), a to především aktivací VEGF a VEGFR (Masood et al. 2002).

3.1.5.7. Adenoviridae:

Někteří zástupci této skupiny virů mají teoreticky také onkogenní potenciál, jak dokázaly pokusy na laboratorních zvířatech. Nejdůležitějšími aktéry transformace

jsou virové proteiny E1A a E1B, které opět interagují s antionkogenními geny p53 a pRB a inaktivují je. Jejich onkogenní účinek byl zatím prokázán pouze u zvířat, ale dá se předpokládat, že časem by mohl být potvrzen i u lidí (Kolář et al. 2003).

Přehled jednotlivých virů, které se podílejí na vzniku nádorů u lidí uvádí tab 1. Kromě těchto virů vznikají u některých zvířat nádory vyvolané retroviry, které nesou ve svém genomu onkogen, např. Rousův sarkom u kura domácího, felinní reovirová leukemie (proti tomuto viru je dokonce k dispozici vakcína), Merkelova choroba hovězího dobytka. Onkogeny se do genomu retrovirů dostaly přenesením z hostitele. Hlavní význam retrovirů nesoucích onkogen lze spatřovat v tom, že umožnily odhalení buněčných onkogenů (Wagner a Hewlett 2004).

(tab.1) (Koutecký et al. 2004)

Virus	Nádor	Síla spojení
Papovaviridae		
SV40	mozkové nádory	+
	mezotelion	+
HPV 5, 8 a další	ca kůže u EV	++++
HPV 16, 18 a další	ca děložního čípku	++++
	další ca anogenitální oblasti	+++
	karcinomy hlavy a krku	++
Herpesviridae		
EBV	Burkittův lymfom	++++
	Lymfony u imunosuprimovaných osob	+++
	NPC a snad i další ca Waldeyerova okruhu	++
	Hodgkinova nemoc (50 %)	++
	ca žaludku	+/-
	ca prsu	+/-
HHV8 (KSHV)	Kaposiho sarkom	+++
	maligní lymfom	++
	myelom	+/-
Hepadnaviridae		
HBV	ca jater (HCC)	++++
Flaviviridae		
HCV	ca jater (HCC)	++++
Retroviridae		
HTLV1	T – leukémie dospělých	++++
HTLV2	T – leukémie z vlasatých buněk	++
++++ etiologický vztah lze považovat za prokázaný		
+++ etiologický vztah je velmi pravděpodobný		
++ existují solidní důkazy, že jde o etiologický vztah		
+ podezření, že jde o etiologický vztah		
+/- slabé podezření, že jde o etiologický vztah		
Vysvětlivky zkratk:		
SV40 – simian virus 40; HPV – human papillomavirus; EBV – Epstein-Barr Virus;		
HHV8 – human herpesvirus 8; (KSHV) – Kaposi sarcoma herpes virus; HBV – hepatitis B virus;		
HCV – hepatitis C virus; HTLV1 – human T – leukemia virus 1; HTLV2 – human T – leukemia virus 2;		
EV – epidermodysplasia verucioformis; NPC – nediferencovaný karcinom nosohltanu		

3.1.6. Viry ovlivňující vlastnosti nádorů:

Kromě virů, které jsou dávány do přímého příčinného vztahu se vznikem určitých nádorů, existují také viry, které nádory nezpůsobují, ale jejich přítomnost v nádorových buňkách mění vlastnosti těchto buněk a tím mohou ztěžovat léčbu onemocnění. Jedním z těchto virů je i lidský cytomegalovirus (dále HCMV).

3.2.Lidský cytomegalovirus (HCMV)

3.2.1. Zařazení HCMV do systému:

skupina: dsDNA viry

čeleď: Herpesviridae

podčeleď: Alphaherpesvirinae

rod: Simplex virus

Human herpesvirus 1

Human herpesvirus 2

rod: Varicellovirus

Human herpesvirus 3

Equid herpesvirus 9

rod: Mardivirus

Gallid herpesvirus 2

rod: Iltovirus

Gallid herpesvirus 1

podčeleď: Betaherpesvirinae

rod: Cytomegalovirus

Human herpesvirus 5 (lidský cytomegalovirus)

rod: Muromegalovirus

Murid cytomegalovirus 1

rod: Roseolovirus

Human herpesvirus 6

podčeleď: Gammaherpesvirinae

rod: Lymphocryptovirus

Human herpesvirus 4 (Epstein – Barrové virus)

rod: Rhadinovirus

Human herpesvirus 8 (virus Kaposiho sarkomu)

Saimiriine herpesvirus 2

Ateline herpesvirus 2

rod: Ictalurivirus

Ictalurid herpesvirus 1

(www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB/index.htm)

Lidský cytomegalovirus (dále HCMV) tedy patří do rodu Cytomegalovirus a je také označován také jako Human herpesvirus 5.

3.2.2. Historie viru

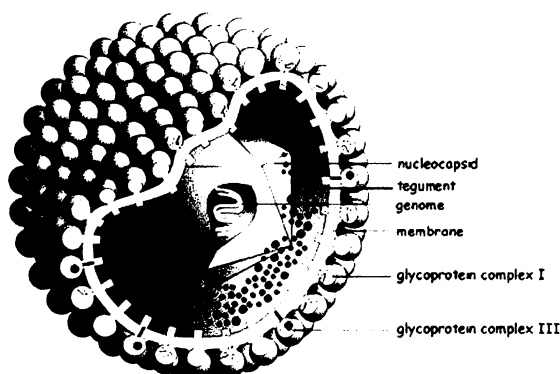
V roce 1904 poprvé byl popsán patologický projev tohoto, v té době neznámého, viru. Jednalo se o zvětšené buňky, dnes nazývané cytomegalie, které Jesionek a Kiolemenoglou pozorovali v játrech, plicích a ledvinách u osmiměsíčního plodu se známkami vrozené syfilidy. Původně se tyto zvětšené buňky označovaly jako protozoovité, protože se předpokládalo, že jsou infikovány intracelulárními protozoálními parazity.

Později byly podobné buňky objeveny i ve slinných žlázách morčat a myší. Nicméně v roce 1950 Smithová a Vellios shrnuli svá pozorování tvrzením, že stejně jako u obdobného onemocnění hlodavců, se i u lidí jedná o virovou infekci. Virus byl označen jako „virus slinných žláz“ (SVG). O šest let později izolovala Smithová HCMV z lidské tkáně. Svůj současný název získal virus až v roce 1960, kdy ho Weller přejmenoval na cytomegalovirus podle charakteristických velkých buněk (Hamilton 1982)

Od té doby je HCMV předmětem intenzivního studia, především z důvodů závažných stavů, které tento virus způsobuje u osob s poruchou imunity a při imunosupresivní léčbě (Plachý et al. 1979).

3.2.3. Morfologie viru

Tento herpetický virus vytváří viriony o průměrné velikosti 120 – 200 nm. Jeho neobalená nukleokapsida má v průměru 100 - 110 nm a na povrchu je chráněna glykoproteinovým obalem. Kapsida vykazuje icosahedrální symetrii a skládá se z 162 kapsomer, které zaujímají tvar pentagonu (12 kapsomer) nebo hexagonu (150 kapsomer). Velikost jedné kapsomery je 135 x 95 Å (Butcher et al. 1998).

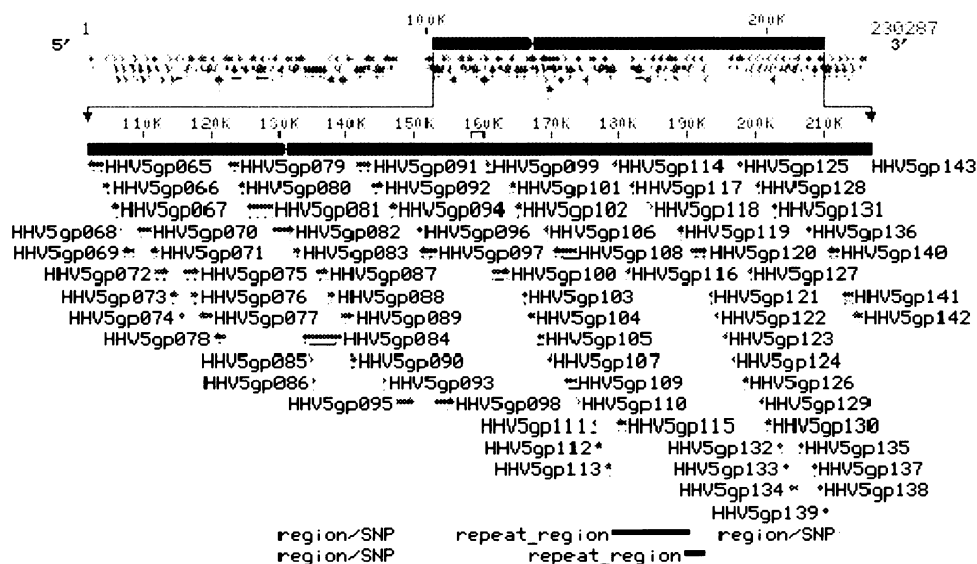


Copyright 1994 - '97 Mario Reschke

(obr. 2) Lidský cytomegalovirus (www.biografix.de)

3.2.4. Genom viru:

HCMV má nesegmentovaný genom tvořený jednou molekulou dvojitě vláknové DNA o velikosti 2×10^6 nukleotidů. Molekulová hmotnost genomu je 150×10^6 Da a zastoupení guanin-cytosinových párů je 56 %. DNA HCMV kóduje okolo 200 genů a v dnešní době je již plně známa její sekvence. Kromě genů pro nukleokapsidu, kóduje vlastní DNA polymerázu (Plachý et al. 1979).



Legend:

- segment boundaries
- - CDS
- ===== gene
- region/SNP
- █ - other feature
- sequence fragment shown

(obr. 3) Genom HCMV (www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB/index.htm)

3.2.5. Infekce lidským cytomegalovirem

K infekci dochází:

- kapénkovou infekcí
- pohlavním stykem
- transplantací - přenosem infikovaných buněk
- přenosem z matky na plod
- mateřským mlékem

U zdravých lidí bez poruchy obranyschopnosti tento virus zpravidla nezpůsobuje žádné vážné onemocnění a infekce je většinou zcela bezpříznaková. Obecně se dá považovat infekce zdravé populace tímto virem za bezproblémovou. Pouze u velmi malých dětí může způsobovat hepatitidu, gastroenteritidu, pneumonii nebo kojunktivitidu. Jeho rozšíření v dospělé populaci je velmi rozsáhlé a v závislosti na geografické poloze, sociální vrstvě a dalších faktorech kolísá mezi 50 % - 90 % (Cinatl et al. 2004).

Virus napadá široké spektrum hostitelských buněk. Během primární infekce infikuje především makrofágy, endotelie, lymfocyty, granulocyty, epiteliální buňky a fibroblasty. Během latentní infekce se poté usidluje přednostně v kmenových buňkách a prekurzorech myeloidní řady (Hamilton 1982).

Jedním ze závažných projevů viru je kongenitální infekce, kdy dochází k nákaze plodu primární nebo reaktivovanou infekcí matky. U 5 - 10 % dětí se vyvine nejzávažnější forma onemocnění, rozsáhlá infekce se zvláště výrazným postižením CNS a jater. V různém stupni lze pozorovat letargii, křeče, ikterus, petechie, purpuru, hepatosplenomegalii, chorioretinitis, intracerebrální kalcifikace a plicní infiltráty. Jedinci, kteří přežijí, jsou mentálně retardovaní, mají mikrocefalii, motorickou slabost, ztrátu sluchu a chronické postižení jater (Revello a Gerna 2002, Flint 2000).

Další rizikovou skupinou jsou pacienti s imunodeficiencí, jako jsou například pacienti s AIDS. U těchto pacientů často dochází k rozvoji retinitidy, gastroenteritidy, esofagitidy a encefalis-encefalopatie (Flint 2000; Hunninghake 1999).

Poslední rizikovou skupinou jsou pacienti po transplantaci. U nich hrozí nebezpečí rozvoje intersticiální pneumonitis, gastroenteritis, hepatitis-

hepatosplenomegalie, sepse, rejekce štěpu a dalších závažných komplikací (Flint 2000, Hunninghake 1999).

V poslední době ovšem vychází najevo, že stejně jako samotné infekční onemocnění vyvolané lytickým cyklem viru, může být velmi nebezpečná i je jeho dlouhodobá, zpravidla doživotní, bezpříznaková přítomnost v lidském organismu (long term-infection).

3.2.6. *Onkogenní potenciál HCMV*

Vzhledem k tomu, že již bylo popsáno mnoho virů, které díky dlouhodobé infekci v hostitelských buňkách byly schopny navodit nádorovou transformaci a vznik nádorů, byl i HCMV předmětem zájmu vědců, kteří zkoumali jeho možné kancerogenní schopnosti. Hypotéza, že by HCMV mohl být onkogenním virem byla podporována zejména skutečností, že se HCMV s vysokou frekvencí objevuje v buňkách nádorů různého typu, především u nádorů tlustého střeva (Harkins et al. 2002, Kaposiho sarkomu (Van der Berg et al. 1989), maligních gliomů (Cobbs et al. 2002), intraepitheliální neoplasie a karcinomu prostaty (Samanta et al. 2003), karcinomu cervixu (Chan et al. 2001; Lanham et al. 2001) a u nádorů dětského věku, jako např. neuroblastom a nefroblastom (Rosenthal et al. 1993, Huang et al. 1983). HCMV DNA, RNA nebo antigeny byly nalezeny u 30–60 % různých nádorů (Huang et al. 1983). Výsledkem mnoha výzkumů byl však po dlouhé době fakt, že HCMV nebyl označen jako onkogenní.



(obr. 4) Barvení adenokarcinomu tlustého střeva monoklonální protilátkou specifickou pro HCMV protein IE1. Hnědá barva představuje přítomnost viru, zatímco neinfikované buňky zůstávají nezbarveny. Ukázka histologického průkazu HCMV v nádorech (Harkins et al. 2002)

Důkazy zpochybňující onkogenní účinek HCMV:

1. Jednotlivé komponenty HCMV nebyly zjištěny dlouhodobým sledováním subkultury nádorové tkáně.
2. Kultivace normálních lidských buněk společně s HCMV nevyvolala jejich transformaci.
3. Z přítomnosti HCMV v lidských nádorových buňkách jednotlivých orgánů se dají obtížně vyvozovat závěry, protože HCMV infikuje tyto orgány i u velkého procenta zdravých jedinců. Nedá se tedy s určitostí zjistit, zda transformaci buňky vyvolala infekce HCMV, nebo HCMV infikoval již transformovanou buňku.
4. Seroepidemiologické studie zkoumající vztah mezi infekcí HCMV a vznikem nádoru dávaly rozporuplné výsledky.

Výsledkem všech pokusů na prokázání onkogenních schopností HCMV bylo konstatování, že HCMV nebyl klasifikován jako onkogenní virus, ale jeho působení v hostitelských buňkách, ať už nádorových nebo nenádorových, není bez následků. Ačkoliv HCMV přímo transformaci hostitelské buňky nevyvolává, je schopen se svým vlastním životním cyklem přizpůsobit prostředí v buňce tak, že buňka snáze

podlehá transformaci. Na druhou stranu také transformované buňky představují svou pozměněnou biochemickou rovnováhou vnitřního prostředí ideálního hostitele pro HCMV, a sice nesmrtelnou buňku, a zesilují transformační potenciál HCMV, který je u zdravých buněk pravděpodobně velmi nízký.

3.2.7. *Onkomodulace buněk vlivem HCMV*

Způsob jakým HCMV zasahuje do procesu přeměny zdravé buňky v nádorovou se nazývá onkomodulace (Huang et al. 1983). Je to proces, v němž virus přímo nepůsobí maligní transformaci buňky, ale svým metabolismem mění její vnitřní prostředí tak, že může katalyzovat transformační proces. U nádorových buněk může měnit vlastnosti nádoru, a to většinou ve prospěch větší invazivity a odolnosti nádoru vůči chemoterapii (Cinatl et al. 2004).

HCMV pravděpodobně může ovlivňovat hned několik procesů bezprostředně souvisejících s transformací buňky a následným vývojem nádorového onemocnění.

3.2.7.1. *Ovlivnění programované buněčné smrti (apoptózy)*

Jedním z hlavních předpokladů pro transformaci buňky v nádorovou je její vymanění se z kontroly buněčného cyklu a programované buněčné smrti (apoptózy). Nádorové buňky právě tento mechanismus kontroly buněčného dělení blokují, stávají se nesmrtelnými. Indukce apoptózy je také jedním z hlavních nástrojů imunitní obrany těla před virovou infekcí. Některé viry, jako je právě HCMV, mění procesy v buňce tak, že apoptóze nepodléhá. To umožní viru dlouhodobé usazení v organismu. Antiapoptotické mechanismy působení HCMV jsou různé, pravděpodobně v závislosti na tom, jaký typ buněk infikuje.

Například ve fibroblastech úspěšně blokuje apoptózu řízenou adenovirovým proteinem E1A a TNF- α (Zhu et al. 1995). V buňkách, které produkují antionkogenní protein p53, jako jsou např. fibroblasty, buňky hladké svaloviny a endoteliální buňky, je funkce proteinu p53 značně omezena nebo přímo blokována jeho interakcí s produkty metabolismu HCMV (Speir et al. 1994, Muganda et al. 1994, Kovacs et al. 1996). U buněk s nízkou hladinou p53 není způsob inhibice apoptózy HCMV ještě příliš jasný.

Kromě blokování apoptotických proteinů je další možností zvýšení exprese antiapoptotických proteinů v buňkách hostitele, jako je např. Bcl-2, jehož zvýšená exprese v buňkách nakažených HCMV byla potvrzena (Cinatl et al. 1998, Harkins et al. 2002). Stejně jako v případě Bcl-2 se předpokládala souvislost mezi zvýšenou akumulací dalších antiapoptotických proteinů a působením HCMV na hostitelskou buňku. Současné výzkumy poukazují na další důležitý protein - $\Delta Np73\alpha$ isoformu patřící do rodiny p73 proteinů. HCMV zvyšuje koncentraci $\Delta Np73\alpha$ tím, že ho stabilizuje. Zvýšená koncentrace $\Delta Np73\alpha$ pak vede k protekci buňky před apoptózou (Allart et al. 2002). Navíc je dokázáno, že buňky infikované HCMV jsou díky zvýšené expresi $\Delta Np73\alpha$ chemorezistentní. Vlivem infekce HCMV se tak nádor stává agresivnějším. Pokud se ovšem nádorové buňky nejprve podrobí antivirové terapii gancyklovirem, tak je jejich citlivost na chemoterapii obnovena na stejnou úroveň jako u původních neinfikovaných buněk (Cinatl et al. 1998).

Nedávno byl objeven také další protein podílející se na odolnosti infikované buňky vůči apoptóze. Je jím virový protein vICA, který funguje jako supresor buněčné smrti a je kódován genem UL36. Váže se na doménu kaspázy – 8, čímž inhibuje fas - apoptózu (Skaletskaya et al. 2001). Stejnou pozornost si v budoucnu pravděpodobně zaslouží i proteinový produkt virového genu UL37, u kterého se předpokládají podobné vlastnosti jako u vICA (Skaletskaya et al. 2001).

3.2.7.2. *Modulace buněčné migrace*

Pro rozvoj pokročilého stádia nádorového onemocnění - tvorbu metastáz, je nutné, aby nádorové buňky byly schopny uvolnit se z primárního nádoru do cévního oběhu, přichytit se na endotheliální vrstvu a projít jí. Bylo pozorováno, že buňky hladkého svalstva infikované HCMV vykazují zvýšenou pohyblivost (Streblov et al. 2003). Stejně tak byla pozorována migrace neuronálních buněk v rozvíjejícím se myším mozku, které byly infikovány myší variantou HCMV (Shinmura et al. 1999). Teprve nedávno bylo dokázáno, že buňky neuroblastomu, které jsou infikovány HCMV, mají zvýšenou pohyblivost a přilnavost k endotheliálním buňkám (Blaheta et al. 2006). Příčinou je pravděpodobně jeden z integrinů - $\beta 1\alpha 5$, který adhezi řídí a infekce HCMV má pravděpodobně vliv na jeho zvýšenou expresi (Scholz et al.

2000). HCMV má tedy vliv na zvýšení invazivity onemocnění, protože usnadňuje vznik metastáz.

3.2.7.3. Modulace angiogeneze

Dalším mechanismem, jak může HCMV měnit, a tím zhoršovat vlastnosti nádorů, je jeho pravděpodobné ovlivnění angiogeneze. Aby mohl nádor růst a rozvíjet se, je zapotřebí, aby měl neustálý přísun kyslíku a živin. Nádorové buňky jsou schopny podnítit tvorbu nových cév, které zásobování nádoru zajišťují. Pozitivní a negativní regulátory angiogeneze jsou přítomny ve všech buňkách a jenom díky jejich rovnováze je za normálních okolností angiogeneze blokována. Avšak u nádorových buněk, které mají změněné vnitřní prostředí, převažují pozitivní regulátory angiogeneze. HCMV může svou přítomností v buňce významně přispět ke vzniku změn vnitřního prostředí nádorové buňky, a tím podpořit samotnou angiogenezi. Například cytokinin TNF- α , který je dáván do souvislosti s infekcí HCMV stimuluje produkci pozitivních regulátorů angiogeneze (Nabors et al. 2003). Naproti tomu HCMV infekce způsobuje snížení thrombospondinu-1 (TSP-1), což je negativní regulátor angiogeneze, čímž opět napomáhá angiogenezi (Cinatl et al 1999)

3.2.7.4. Modulace signálních drah a produkce transkripčních faktorů

Jedním z posledních a zároveň velice komplexních způsobů, jak může HCMV měnit vlastnosti nádorových buněk, je ovlivnění signálních drah a produkce transkripčních faktorů.

K prvnímu zásahu do regulačních a signálních drah buňky dochází velice brzy. Už při samotném navázání viru na buněčný povrch. Bylo dokázáno, že vlivem HCMV hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát za vzniku signálních molekul inositol 1,4,5-trifosfátu, 1,2-diacylglycerolu a vzrůstá metabolismus kyseliny arachidonové (Albrecht et al. 1993). Druzí poslové pak aktivují kinázy, které řídí další fosforylace specifických proteinů, čímž mohou značně ovlivnit expresi některých genů, včetně těch, které regulují buněčný cyklus. HCMV tak může zvýšit transkripci proto-onkogenů, jakými jsou např. c-fos, c-jun nebo c-myc (Albrecht et al. 1993).

Kromě aktivace vlivem navázání HCMV na membránové receptory může být buněčná signalizace a exprese narušena ranými produkty virové exprese. Bylo doloženo několika studiemi, že rané virové proteiny IE1 a IE2 jsou schopny ať už samostatně nebo dohromady, fungovat jako promotory různých virových, ale i hostitelských genů (Monick et al. 1992, Ghazal et al. 1993). Z hlediska onkogeneze je nejdůležitější jejich schopnost aktivovat transkripci proto-onkogenů c-myc a c-fos (Monick et al. 1992, Ghazal et al. 1993).

Kromě narušení regulačního mechanismu buňky svými vlastními produkty nebo změnou exprese hostitelských genů existuje ještě jeden způsob, jak může HCMV zasáhnout do normálního buněčného cyklu hostitelské buňky a napomoci změně v nádorovou. Virové produkty IE genů mohou také kromě svých vlastních nebo hostitelských genů aktivovat promotory genů jiných virů, které se v tom samém okamžiku vyskytují v buňce, např. LTR promotor HIV, TK promotor HSV (herpes simplex virus) TK, NCR promotor HPV 18 (lidský papillomavirus 18), pozdní geny SV40 a promotory C a S HBV. Tím, že zaktivují ty „pravé“ onkogenní viry, se mohou nepřímo podílet na transformaci napadené buňky (Ghazal et al. 1993).

3.3. Detekce HCMV pomocí real-time PCR

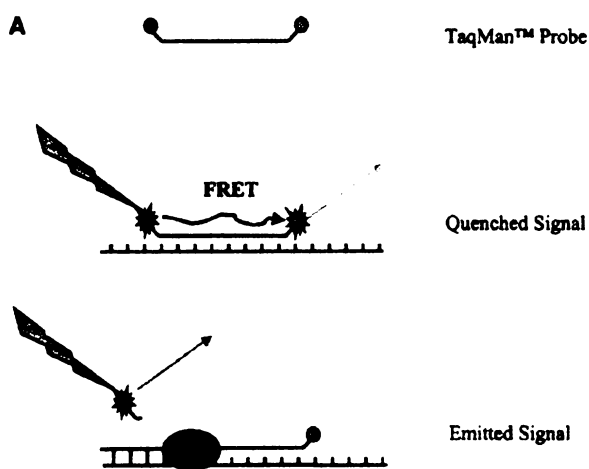
Princip **polymerázové řetězové reakce** byl navržen v roce 1983 Karym Mullisem a poskytl citlivou metodu detekce známé sekvence DNA. Metoda je založena na využití termostabilní DNA dependentní DNA polymerázy pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*, jejíž teplotní optimum se nachází okolo 75°C (*Taq* polymeráza). Tato polymeráza je schopna syntetizovat předem určené úseky DNA za teploty, kdy je DNA dvojšroubovice plně denaturována a tudíž umožňuje polymeráze snadné nasednutí a replikování řetězce. Specifita replikace je dána námi volenými primery, které vymezují oblast, kterou chceme replikovat.

Princip reakce spočívá v opakovaném střídání teplotních cyklů. Během jednoho cyklu je DNA nejprve vystavena teplotě okolo 95°C, tak aby denaturace řetězců dvojšroubovice byla dokonalá, poté teplotě v rozmezí 55 - 60°C pro optimální nasednutí primerů (teplota je individuální pro každou dvojici primerů) a na závěr teplotě okolo 75°C pro replikaci. Po dokončení replikace nastupuje opět začátek dalšího cyklu, kdy denaturují dvojřetězcové struktury, včetně nově nasyntetizovaných, a následuje nová replikace. Množství kopií replikovaného úseku vymezeného primery se za optimálních podmínek každým cyklem zdvojnásobuje a po dvaceti cyklech z jedné jediné sekvence získáme při stoprocentní účinnosti okolo jednoho milionu kopií (2^{20} tj. 1 048 576). Ve skutečnosti je úspěšnost nižší, čemuž odpovídá i menší množství vzniklých kopií hledané sekvence v produktu reakce.

Během let používání této metody se ze základního schématu PCR vyvinuly různé specializované varianty, které lépe vyhovují požadované aplikaci, jako např. kvantitativní PCR, RT PCR, asymetrická PCR, atd. Jednou z nejnovějších metod založených na principu PCR, která umožňuje kvantifikaci produktu, je **real – time PCR**.

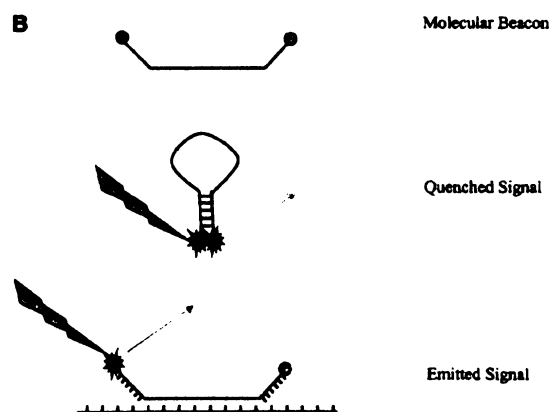
První metoda, která se snažila o sledování akumulace PCR produktu v reálném čase, byla popsána v roce 1993 a využívala interkalační činidlo – ethidium bromid, který vizualizoval nárůst syntetizované DNA (Higuchi et al. 1993). V dnešní době se ale používají především TaqMan próby (Heid et al. 1996), molekulární majáky (Tyagi et al. 1996) a interkalační barvy, např. SYBR Green I (Yin et al. 2001).

Metoda využívající TaqMan próby je založena na 5' → 3' exonukleázové aktivitě *Taq* polymerázy. Kromě specifických primerů nasedá na templátovou DNA ještě sekvenčně specifická próba značená dvěma fluorescenčními barvami. Na 5'konci je navázaná tzv. reporter dye čili signální barva, jejíž emisní spektrum je pohlčeno barvou navázanou na 3'konci tzv. quencher dye čili zhášec. Při postupu polymerázy po řetězci je próba, která hybridizuje někde mezi oběma primery, postupně štěpena z 5'konce polymerázou. Tím se odštěpí reporter dye od próby a její vyzařování již není blokováno, viz obr.5. (Heid et al. 1996, Jebbink J et al. 2003).



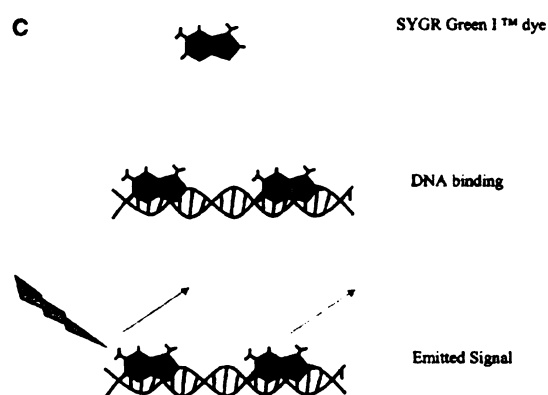
(obr. 5) TaqMan próba (Ginzinger DG 2002)

Molekulární majáky využívají stejně jako TaqMan próby principu zhášení. Na rozdíl od próby však k samotné fluorescenci není zapotřebí štěpení polymerázou, ale pouhá hybridizace s templátovou DNA. Maják se nenavázaný vyskytuje ve formě vlásenky, čímž jsou obě molekuly barev k sobě přiblíženy a fluorescence signální barvy je zhášena, viz obr. 6. Při hybridizaci je však vlásenka rozbalena, barvy se od sebe oddálí a efekt zhášení je téměř nulový (Tyagi et al. 1996).



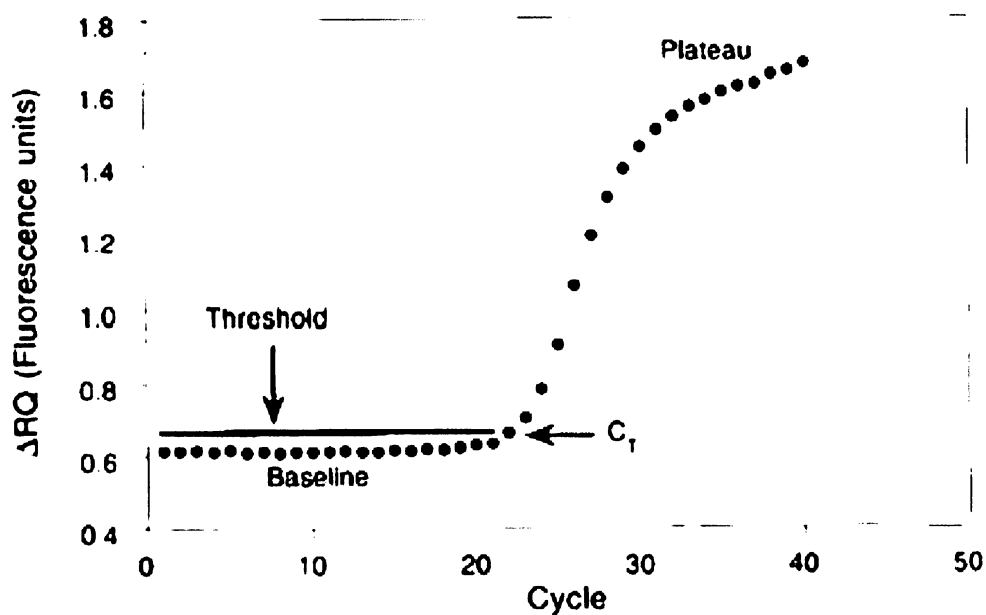
(obr. 6) Molekulární maják (Ginzinger DG. 2002)

Využití interkalační barvy SYBR Green je ze všech popisovaných metod nejjednodušší a také nejlevnější. Barva se váže přímo na dsDNA a navázaná emituje světlo, viz obr. 7. Není zapotřebí žádného dalšího upraveného oligonukleotidu nebo próby. Nevýhodou této metody je, že interkalační barva se váže nejen k námi amplifikované sekvenci, ale i na jiné řetězce nebo primerové dimery (Yin et al. 2001).



(obr. 7) Interkalační barva (Ginzinger DG. 2002)

Postupný nárůst emitovaného fluorescenčního světla během cyklů se zachycuje a reakce je tedy pozorována v reálném čase. Výsledky jsou zaznamenány do grafu, kde na ose X je počet cyklů a na ose Y míra fluorescenčního záření. Pro další využití je důležitá hodnota C_T , která určuje v kolikátém cyklu reakce fluorescenční záření dosáhlo intenzity detekovatelné přístrojem, viz obr. 8. Z této hodnoty lze vypočítat počáteční množství sledovaného úseku DNA (čím více DNA, tím dříve detekujeme produkt = nižší hodnota C_T) (Heid et al. 1996).



(obr. 8) Real-time PCR (Heid CA et al. 1996)

Výhodou real-time PCR je i to, že na rozdíl od předešlých PCR je minimalizováno riziko kontaminace, protože k PCR reakci, následné detekci a kvantifikaci PCR produktu dochází v jedné zkumavce, a není tudíž zapotřebí žádných dalších manipulací se vzorkem.

Využití real-time PCR je poměrně široké. Uplatňuje se ve studiích mRNA exprese, v měření množství DNA kopií, v zjišťování množství v transgenů, v pozorování alelické diskriminace (Ginginer 2002), v detekci virové DNA a v diagnostice nádorových onemocnění (Bernard et al. 2002)

Výhoda využití real-time PCR pro detekci virového genomu v nádorové tkáni spočívá především v tom, že metoda nerozlišuje, jestli se virus nachází v aktivní nebo pasivní fázi svého životního cyklu.

3.4. Nádory dětského věku:

Ačkoli se nádorová onemocnění u dětí vyskytují nepoměrně méně než u dospělých (představují zhruba 1 % jejich celkového počtu), přesto jsou v pořadí příčin úmrtí dětí do 15 let věku na druhém místě. Nejčastější příčinou úmrtí v dětském věku jsou poranění, takže z hlediska smrtelných onemocnění vedou nádory na prvním místě.

Nádorové choroby dětí jsou sice vzácné, nicméně závažné, jak nesnadným záchytem, složitým průběhem, agresivní léčbou provázenou závažnými komplikacemi, tak nepříznivou prognózou, ve srovnání s jinými chorobami dětského věku. Podstatný rozdíl proti dospělým onkologickým pacientům je ve výskytu jednotlivých druhů nádorů a tím i jejich orgánové lokalizaci. U dětí tvoří podstatnou většinu (80 %) nádorových onemocnění hemoblastózy a hemoblastomy, nádory z tkáně nervové, mezenchymální a z nezralých buněk zárodečných listů, zatímco 80 % nádorů dospělých představují karcinomy. Další zvláštností onkologie dětí je fakt, že na rozdíl od dospělé populace, kde se s přibývajícím věkem frekvence onemocnění nádorem zvyšuje, u dětí je nejvyšší frekvence výskytu během prvních pěti let života a poté frekvence onemocnění klesá (Koutecký 1997). Ve srovnání s nádorovými chorobami dospělých jsou nádory u dětí podstatně lépe vyléčitelné, v současné době je dlouhodobé přežití zhruba 75 %. Na klinice dětské onkologie v Motole bylo pětileté přežití dětí se zhobným nádorem v letech 1996 – 2000 74,8 % (Šmelhaus a Koutecký 2003)

3.4.1. Neuroblastom

Neuroblastom je nádor, který se vytváří z buněk sympatických ganglií. Je to nádor biologicky velmi variabilní. Podle stupně zralosti se rozlišuje neuroblastom, ganglioneuroblastom a zcela benigní ganglioneurom. Obecně se dá říci, že neuroblastom roste velmi rychle a časně vytváří metastázy. Okolo dvou třetin pacientů v době stanovení diagnózy má již v těle metastázy. Nádor je endokrinně aktivní a produkuje velké množství katecholaminů. Některé neuroblastomy mohou produkovat vazoaktivní střevní peptid (VIP), který pacientům způsobuje chronický průjem. Neuroblastomy, zvláště nepříznivé prognózy, mají delecí krátkého raménka chromozómu 1 (ztráta supresorového nádorového genu) a amplifikaci oknogenu N-myc. Léčba pokročilých stádií neuroblastomů je problematická a nepřináší výraznější úspěchy. U raných stádií je šance na vyléčení 78 - 90 %, zatímco u pacientů s kostními metastázemi po velmi intenzivní terapii 30 – 40 % (Šmelhaus 1997b).

3.4.2. Ewingův sarkom

Podle výzkumů posledních let se předpokládá, že tento nádor se diferencuje z buněk neuroepiteliálního původu. Postihuje převážně dlouhé a ploché kosti, ale může se vyskytovat i jinde. Zhruba polovina postihuje končetiny, 20 % pánev a 15 % hrudní stěnu. Nádor se šíří hematogenní cestou a okolo 25 % nemocných má v době diagnózy již metastázy (především postihují plíce, kosti a kostní dřeň). U většiny Ewingových sarkomů lze cytogeneticky dokázat translokaci mezi 11. a 22. chromozómem: t(11;22)(q24;q12) vzácněji jiné translokace postihující gen *ews* na 22. chromozomu: t(21;22), t(2;22), t(7;22), t(17;22) nebo translokace komplexní. Onkogen *n-myc* na rozdíl od neuroblastomu nebývá exprimován ani amplifikován. Po intenzivní chemoterapii, operaci a následující radioterapii přežívá až 70 % pacientů (Šmelhaus 1997a).

3.4.3. Sarkomy měkkých tkání

Rhabdomyosarkom je u dětí nejčastějším nádorem ze skupiny sarkomů měkkých tkání (60 – 75 %). Nejčastěji se vyskytuje u pacientů okolo čtvrtého roku života a v pubertě. Postihuje především hlavu a krk, dále pak urogenitální oblast, méně často svalstvo končetin a trupu. V oblasti hlavy postihuje dutinu nosní, paranazální uzliny, nazofarynx, orbitu, střední ucho, zvukovod, dutinu ústní, tváře, měkké tkáně krku a larynx. Urogenitální rhabdomyosarkom je nejčastěji paratestikulární, v močovém měchýři, prostatě a vagině. Metastázuje nejčastěji do plic, lymfatických uzlin a kostní dřeně. U dětí je naděje na uzdravení lepší než u dospělých. U časnějších stádií přežívá okolo 60 – 80 % pacientů. U pozdějších stádií je bohužel prognóza špatná, pouze okolo 20-40%. Do této skupiny patří dále jiné nádory jako je fibrosarkom, synoviosarkom, maligní fibrozní histiocytom a nediferencované sarkomy. Terapie těchto nádorů je u dětí méně úspěšná než léčba rhabdomyosarkomu (Kavan 1997c).

3.4.4. Hodgkinův lymfom

Jedná se o nádorové onemocnění lymforetikulárního systému. Přesná příčina vzniku není dosud známá, ale za jedno z velmi pravděpodobných agens se považuje virus Epstein-Barr. Tento virus je schopný transformovat lymfocyty

a u pacientů nemocných akutní mononukleózou byly v lymfoidních tkáních pozorovány buňky podobné buňkám Hodgkinova lymfomu. Osoby s prodělanou mononukleózou mají také 3x vyšší riziko onemocnění tímto nádorovým onemocněním. U dětí není výskyt příliš častý, okolo 7%, přesto je to desetkrát více, než u dospělých. Toto onemocnění má jednu z nejlepších prognóz v dětské onkologii. U pacientů s onemocněním v raných stádiích je naděje na vyléčení téměř 100%, v pokročilejších stádiích mezi 60 – 90 % (Kavan 1997a).

3.4.5. Non-Hodgkinův lymfom

Názvem Non-Hodgkinův lymfom se nazývá heterogenní skupina nádorů postihující lymfopoetický systém. Transformaci podléhají v polovině případů zralé B progenitorové buňky a ve 40 % případů T buňky. U dětí je Non-Hodgkinův lymfom v rámci nádorových onemocnění velmi častý, v převážné většině se jedná o vysoce maligní lymfomy. Zvláštní podskupinu tvoří endemický africký Burkittův lymfom, který je stejně jako Hodgkinův lymfom dáván do etiologického vztahu s virem Epstein–Barrové. Nicméně u ostatních zástupců této skupiny vztah s EBV nebyl prokázán. V 70 – 90 % případů jsou v nádoru cytogeneticky detekované specifické chromozomální aberace, nejčastěji translokace. V jedné třetině případů postihuje primárně onemocnění oblast břicha, v jedné třetině oblast mediastina a dále pak krční a periferně uložené uzliny, nazofarynx, kosti, vzácně orbitu, varlata, vaječníky, mammu, kůži a mozek. Naděje na přežití se pohybuje mezi 75 – 85% (Kavan 1997b).

3.4.6. Nádory centrální nervové soustavy

Tyto nádory patří mezi nejhůře léčitelná maligní onemocnění. Malá úspěšnost léčby nespočívá ani tak v agresivitě onemocnění, ale především v obtížnosti léčby. Tím, že postihuje mozek a míchu, je chirurgická léčba znesnadněna nebezpečím poškození vitálně nebo funkčně důležitých struktur. Dalším znesnadňujícím faktorem je fakt, že nervové buňky patří mezi nejvíce radiorezistentní. Mezi nejčastější nádory CNS patří meduloblastom, ependyom a astrocytomy.

Meduloblastom:

Jedná se o nejčastější nádor CNS u dětí a nejčastěji postihuje vermis mozečku. Nejvyšší výskyt je u dětí okolo pátého roku života. Prognóza tohoto onemocnění souvisí s velikostí nádoru a rozsahem onemocnění. Pětiletého přežití se dožívá 50 – 60 % dětí. Obecně se dá říci, že u pacientů s rozvinutými metastázami je naděje na vyléčení velmi nízká.

Ependymon:

Ependymon je druhý nejčastější nádor CNS a pětiletého přežití se nedožije ani 50 % pacientů.

Astrocytomy:

Tato skupina nádorů zahrnuje jak nádory svou biologickou povahou benigní (pilocytické astrocytomy), tak nádory vysoce maligní (glioblastoma multiforme). S největší frekvencí se vyskytují v mozečku, dále pak v mozkových hemisférách, thalamu, hypothalamu a bazálních gangliích. Pokud není možné nádor chirurgicky odstranit je prognóza i u benigních forem zpravidla špatná (Mališ 1997a).

3.4.7. Germinální nádor

Germinální nádory jsou také velmi heterogenní skupina, a to jak do míry malignity, tak do histologické stavby. Mají původ v maligně zvrhlé zárodečné buňce. Třídí se na poměrně velké množství jednotlivých typů (teratom, germinom, gonadoblastom a další). Cytologicky jsou v těchto nádorech často nalézány změny chromozómů 1 a 12, které jsou dávány do souvislosti s aktivací onkogenu n-ras. Prognóza germinálních nádorů závisí jednak na histologickém typu, ale i na klinickém stádiu a lokalizaci. Obecně u nádorů benigních a nádorů s nejistým chováním po odstranění k recidivě nádoru nedochází, ale i maligní formy jsou relativně dobře léčitelné pro svoji citlivost k záření a chemoterapii (Eckschlager 1997).

3.4.8. Nefroblastom:

Nefroblastom je také nazýván Wilmsův nádor nebo renální embryom. Nádor se vyvíjí z metanefrického blastému a často obsahuje tkáň, které se v normální metanefros nevyskytují (kosterní svalstvo, chrupavku, epitelie). U dětí představuje

5 - 6 % maligních onemocnění. Patří do skupiny nádorů s obecně dobrou prognózou. U raných stádií a příznivých histopatologických typů je šance na úplné vyléčení 90 %. S pozdějšími stádii onemocnění a nepříznivými histopatologickými typy šance klesá (Mališ 1997b).

4. MATERIÁLY A METODY

4.1. Přehled použitých přístrojů:

Centrifuga: EPP 5412 R

Míchačka: Thermomixer comfort

Spektrofotometr: Thermo-spectronic – bio Mate 3

PCR cykler: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

4.2. Biologický materiál:

Vyšetřili jsme 32 vzorků nádorové tkáně, 15 vzorků kostní dřeně, 5 vzorků periferní krve a 7 vzorků benigní afekce získaných od 43 pacientů. Přehled jednotlivých vyšetřených vzorků viz kapitola výsledky. Jednalo se o biologický materiál odeslaný k vyšetření do laboratoře průtokové cytometrie a molekulární biologie KDHO UK LF a FN Motol, který mohl být využit k výzkumným účelům.

4.3. Izolace buněčné a virové DNA:

Izolaci buněčné a virové DNA jsme provedli za pomoci DNA izolačního kitu: Wizard Genomic DNA Purification Kit od firmy Promega. Izolace probíhala během tří po sobě jdoucích dnů.

4.3.1. První den

Pro každý vzorek buněčné tkáně o velikosti cca 1 mm³ jsme namíchali roztok 120 µl 0,5M EDTA a 500 µl Nuclei Lysis Solution a po celou dobu manipulace ho uchovávali na ledu. Jednotlivé vzorky jsme vložili do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidali k nim 600 µl roztoku EDTA/Nuclei Lysis Solution. Každý vzorek jsme vortexovali na maximální rychlost 30 – 60 sekund, dokud nebyla suspenze buněk řádně rozbita. Poté jsme přidali 25 µl proteinázy K a inkubovali jsme vzorky přes noc na míchačce při 55°C.

4.3.2. Druhý den

Ke zlyzovaným buňkám jsme přidali 3 μ l Rnase Solution a opatrně mikrozkuřavky párkrát převrátili a nechali inkubovat za mírného míchání 30 min při 37°C tak, aby se RNA řádně rozštěpila.

Poté co jsme je nechali zchladnout na pokojovou teplotu, přidali jsme 200 μ l Protein Precipitation Solution a vortexovali jsme je maximální rychlostí po dobu 20 sekund. Vzorky jsme nechali 5 min zchladit na ledu.

Vysrážené proteiny jsme oddělili centrifugací při 13500 x G po dobu 5 min. Proteiny vytvořily bílou peletu.

Opatrně jsme supernatant odebrali pomocí pipety a přenesli ho do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkuřavky obsahující 600 μ l isopropanolu. Několikrát jsme zkuřavku pomalu převrátili, dokud nebyla vidět relaxovaná vlákna DNA.

Vzorek jsme centrifugovali při 13500 x G po dobu 2 min. DNA vytvořila malou bílou peletu. Opatrně jsme slili supernatant tak, abychom si nevyplavili peletu, a promyli jsme jí 600 μ l 70% ethanolu.

Opět jsme centrifugovali při 13500 x G po dobu 2 min a supernatant slili. Přečištěnou peletu jsme nechali schnout v mikrozkuřavce dnem vzhůru po dobu 10 min. Nakonec jsme podle velikosti pelety přidali 20 – 50 μ l Rehydration Solution a nechali DNA rozpouštět jednu hodinu za mírného míchání při 65°C. Poté jsme nechali vzorky rehydratovat ještě přes noc při pokojové teplotě.

4.3.3. Třetí den

Vzorky jsme buď rovnou dále zpracovávali nebo je skladovali v lednici při 4°C.

4.4. Kontrola čistoty izolované DNA:

Čistotu a množství vyizolované DNA jsme přeměřili spektrofotometricky. Do 495 μ l DNA free vody jsme přidali 5 μ l vyizolovaného vzorku. Všechny 500 μ l jsme přenesli do kyvety a dvakrát změřili absorbanci a koncentraci DNA. Z dalšího postupu jsme vyloučili vzorky jejichž A_{280}/A_{260} byla nižší než 1,7.

4.5. Stanovení citlivosti detekce HCMV pomocí real-time PCR:

Pro zjištění citlivosti detekce HCMV metodou real-time PCR jsme si připravili ředící řadu HCMV laboratorního kmenu AD169 laskavě poskytnutého Prof. J. Činátlem z Institut für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang JW Goethe – Universität, Frankfurt am Main o koncentraci 1×10^8 PFU/ ml v ředění:

1. neředěný HCMV (1×10^8 PFU/ ml)
2. 10x (1×10^7 PFU/ ml)
3. 100x (1×10^6 PFU/ ml)
4. 1 000x (1×10^5 PFU/ ml)
5. 10 000x (1×10^4 PFU/ ml)
6. 100 000x (1×10^3 PFU/ ml)
7. 1 000 000x (1×10^2 PFU/ ml)

Naředěné vzorky jsme použili pro real-time PCR reakci, viz následující kapitola, s tím rozdílem, že jsme nechali reakci projít pouze 40 cykly.

4.6. Detekce virové DNA pomocí real-time PCR:

Polymeráza:

Pro naši real-time PCR reakci jsme použili Hot Start TaqManPolymerázu.

Primery a próba pro HCMV (Applied Biosystems UK):

Forward primer: 5' CGT TGG TGT TGT AGC AAC TGG C 3'

Reverse primer: 5' TGT GCT CAA AGA GGT CGA GTT CC 3'

Proba: 5' VIC – CGC GAA GGT GTG GCG GCA G-TAMRA 3'

Kontrolní lidský gen:

Pro kontrolu účinnosti real-time PCR jsme použili komerční kit TaqMan Rnase P Control Reagents (VICTM dye).

Kontrolní HCMV:

Pro kontrolu specifity reakce a primerů vůči hledané virové DNA jsme použili laboratorně pěstovaný HCMV laboratorní kmen AD169 laskavě poskytnutého Prof.

J. Činátlem z Institut für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang JW Goethe – Universität, Frankfurt am Main o koncentraci 1×10^8 PFU/ ml v ředění.

Negativní kontrola:

Pro kontrolu kontaminace reakce cizí DNA jsme u každé reakce místo jednoho vzorku použili DNA free H₂O.

Postup:

Pro každý vzorek jsme připravili čtyři optické mikrozkušavky. Dvě zkumavky pro PCR s primery a próbou komplementární k HCMV a dvě zkumavky pro PCR s kontrolními primery a próbou. Reakční směs jsme namíchali v následujícím poměru:

HCMV pro 1 mikrozkušavku (25 μ l):

TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	12,5 μ l
1.primér	3 μ l
2.primér	3 μ l
HCMV próba	1 μ l
H ₂ O	3,5 μ l
templátová DNA	2 μ l

RnÁza P (kontrolní gen) pro 1 mikrozkušavku (25 μ l):

TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	12,5 μ l
Primery + próba	1,25 μ l
H ₂ O	9,25 μ l
templátová DNA	2 μ l

Program:

2 min	50°C
10 min	95°C
45 cyklů:	
0,15 min	95°C
1 min	60°C

4.7. Statistické zpracování výsledků:

Zpracované vzorky jsme rozdělili podle dvou kritérií: podle přítomnosti HCMV ve tkáni a podle toho, zda u onemocnění nastala alespoň částečná remise nebo ne. Vše jsme zpracovali do tabulky:

(tab. 2)

skupina	vzorky HCMV pozitivní	vzorky HCMV negativní	celkem
Pacienti s remísí onemocnění	a	b	(a+b)
Pacienti bez remise onemocnění	c	d	(c+d)
celkem	(a+c)	(b+d)	n

Statistický rozdíl jsme vzhledem k nízkým četnostem vyhodnotili Fisherovým faktoriálovým testem (Anděl 1978):

$$p = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{n! a! b! c! d!}$$

Podle hodnoty **p** jsme určili hladinu významnosti rozdílu:

$p > 0,05$ rozdíl není významný

$0,05 > p > 0,01$ rozdíl je významný

$p < 0,01$ rozdíl je velmi významný

5. VÝSLEDKY

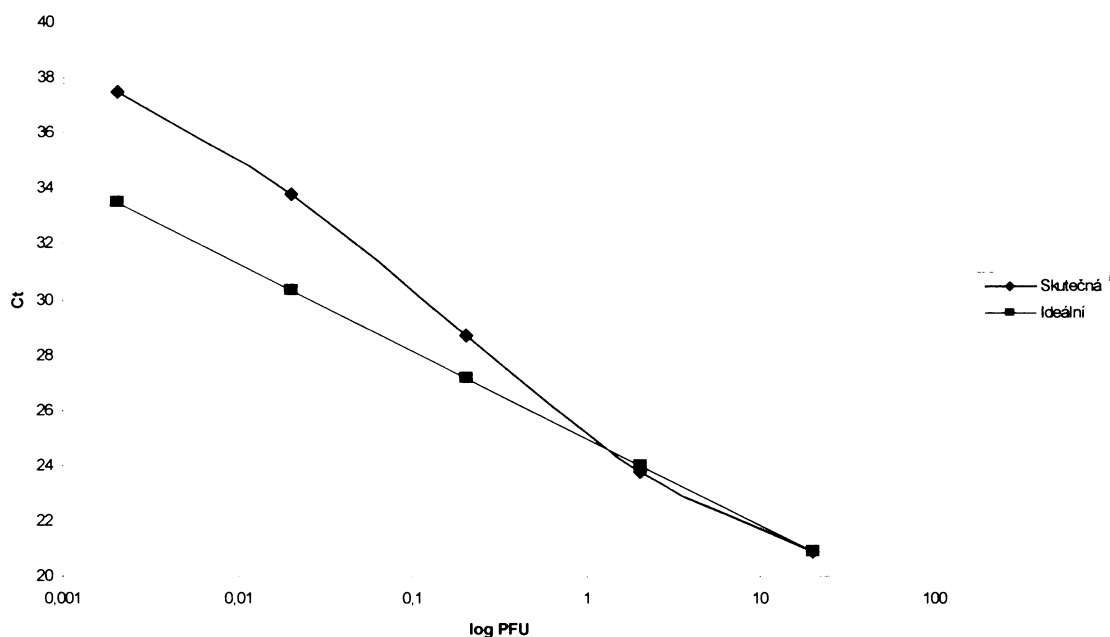
5.1. Citlivost metody:

(tab. 3)

číslo vzorku	ředění	C_T
1	neředěný	20,86
2	10x	23,78
3	100x	28,7
4	1 000x	33,79
5	10 000x	37,5
6	100 000x	40
7	1 000 000x	37,51

Jak vyplývá z výsledků vyšetření, jsme schopni spolehlivě detekovat 1×10^4 PFU/ ml, což odpovídá 2×10^1 PFU na reakci. Výsledky C_T v jednotlivých ředění se až na výjimku mezi 3. a 4. vzorkem pohybují kolem 3,16 (druhá odmocnina z 10) jak odpovídá rozdílu jednoho řádu. Hraniční pozitivitu v 7. ředění a negativitu v 6. ředění lze vysvětlit náhodnou přítomností virové partikule při vysokém ředění viz tab. 3. Korelaci mezi C_T a koncentrací viru v PFU naměřených hodnotách a ideální křivkou zobrazuje graf 1. Ideální křivka byla vytvořena z hodnot vypočtených podle následujícího postupu. Pro neředěný vzorek (2 PFU) jsme použili hodnoty změřeného C_T a C_T , pro další ředění jsme vypočítali přičtením 3,16, protože $10 \cong 2^{3,16}$.

(graf 1)



5.2. Vyšetřené vzorky:

Metodou real – time PCR jsme vyšetřili 59 biologických vzorků od 43 pacientů. Ve třech případech (tj. 9,68%) jsme detekovali HCMV ve tkáni zhoubných nádorů (Ewingův sarkom hrudní stěny, germinální nádor mediastina – smíšený teratom s maligní transformací do embryonálního rhabdomyosarkomu a gastrointestinální stromální nádor žaludku), viz tab.4. V jedné z benigních afekcí byl hraniční nález. Jednalo se o benigní lymfadenopatii u pacienta v kompletní remisi po prodělané léčbě pro lymfoblastickou leukémii, který je více než 3 roky po odstranění uzliny v pořádku. Dva pacienti s maligními nádory (Ewingův sarkom a germinální nádor) zemřeli a pacientka s GIST je ve stabilizovaném stavu s inoperativním nádorem. U pacientů s remisí nebyl HCMV detekován ani jednou. Tento rozdíl byl statisticky významný (Fisherův faktoriálový test, $p = 0,013$), viz tab.5 a graf 2. Ve vzorcích kostní dřeně a periferní krve jsme HCMV neprokázali.

(tab. 4)

číslo vzorku	Diagnóza	stav	vzorek	C _T HCMV	C _T kontrola
1a	HR NBL	CR	Tu	45	19,3
1b	HR NBL	CR	KD	45	30,47
2a	HR NBL	DD	PK	45	17,86
2b	HR NBL	DD	Tu	45	19,82
3	HR NBL	CR	Tu	45	18,1
4	MR NBL	DD	Tu	45	17,83
5	MR NBL	VGPR	Tu	45	17,39
6a	LR NBL	VGPR	Tu	45	18,04
6b	LR NBL	VGPR	KD	45	24,5
6c	LR NBL	VGPR	KD	45	18,17
7	EW	DD	Tu	37,75	24,45
8a	EW	DD	KD	45	32,08
8b	EW	DD	KD	45	30,47
9a	EW	CR	Tu	45	17,11
9b	EW	CR	KD	45	17,1
9c	EW	CR	KD	45	17,13
10	EW	CR	KD	45	25,95
11	EW	PR	KD	45	26,65
12	EW	PR	PK	45	36,95
13a	RMS	Relaps	Tu	45	17,7
13b	RMS	Relaps	KD	45	20,4
13c	RMS	Relaps	KD	45	17,09
14a	RMS	PD	Tu	45	27,46

číslo vzorku	Diagnóza	stav	vzorek	C _T HCMV	C _T kontrola
14b	RMS	PD	Tu	45	24,43
14c	RMS	PD	PK	45	27,55
15	RMS	CR	Tu	45	23,99
16a	NHL	CR	Tu	45	22,87
16b	NHL	CR	KD	45	27,55
17	NHL	CR	KD	45	23,51
18a	NHL	CR	Tu	45	32,2
18b	NHL	CR	KD	45	25,26
18c	NHL	CR	KD	45	23,86
19	NHL	CR	Tu	45	22,6
20	GN mediastina	DD	Tu	16.23	35,66
21a	GN testis	CR	PK	45	18,8
21b	GN testis	CR	PK	45	32,9
21c	GN testis	CR	Tu	45	22,9
22	GN vaginy	CR	Tu	45	22,95
23	anaplastický ASTR III	DD	Tu	45	34,85
24	ASTR I	CR	Tu	45	16,5
25	ASTR II	CR	Tu	45	25,7
26	NFR	CR	Tu	45	23,72
27	NFR	CR	Tu	45	21,45
28	HODG	CR	Tu	45	26,11
29	HODG	CR	Tu	45	21,3
30	lymfostemopatie	CR	Tu	45	29,1
31	fibrosarkom	PR	Tu	45	37,98
32	meduloblastom	CR	Tu	45	32,53
33	anaplastický ependymon	DD	Tu	45	19,4
34	nediferencovaný sarkom	DD	Tu	45	18,24
35	GIST	SD	Tu	21,8	20,1
36	pleuropulmonální blastom	CR	Tu	45	20,55
37	BA	CR	Tu	45	25,46
38	BA	CR	Tu	41,38	16,15
39	BA	CR	Tu	45	29,1
40	BA	CR	Tu	45	26,04
41	BA	CR	Tu	45	25,22
42	BA	CR	Tu	45	34,05
43	BA	CR	Tu	45	17,44

Vysvětlivky:

HR NBL – vysoce rizikový neuroblastom
MR NBL – středně rizikový neuroblastom
LR NBL – nízké rizikový neuroblastom
EW – Ewingův sarkom
RMS - rhabdomyosarkom
NHL – Non-Hodgkinův lymfom
GN – germinální nádor
ASTR I. – astrocytom grade I.
ASTR II. – astrocytom grade II.
ASTR III. – astrocytom grade III.
NFR - nefroblastom
HODG – Hodgkinův lymfom
GIST – gastrointestinální stromální nádor
BA – benigní afekce
CR – kompletní remise onemocnění
DD – pacient zemřel na onemocnění
PR – parciální remise onemocnění
PD – progres onemocnění
VGPR – velmi dobrá parciální remise
SD – stabilizovaný stav onemocnění
Tu – nádorová tkáň
KD – kostní dřeň
PK – periferní krev

Biologické vzorky: 32 vzorků zhoubných nádorů
7 vzorků benigní afekce
15 vzorků kostní dřene
5 vzorků periferní krve

Diagnózy vzorků:

- 10x neuroblastom
- 9x Ewingův sarkom
- 7x rhabdomyosarkom
- 7x Non-Hodgkinův lymfom
- 5x germinální nádor
- 3x astrocytom
- 2x nefroblastom
- 2x Hodgkinův lymfom
- 1x fibrosarkom
- 1x meduloblastom
- 1x anaplastický ependymon
- 1x nediferencovaný sarkom
- 1x gastrointestinální stromální nádor
- 1x pleuropulmonální blastom
- 7x benigní afekce

Současný stav pacientů:

- 27x kompletní remise
- 2x velmi dobrá parciální remise
- 3x parciální remise
- 1x progrese onemocnění
- 1x relaps onemocnění
- 1x stabilizovaný stav
- 8 zemřelo na onemocnění

HCMV diagnostikováno u: 3/32 tkání zhoubných nádorů

- 0/15 kostních dřeni
- 0/5 periferních kreví
- 1/7 benigních afekcí

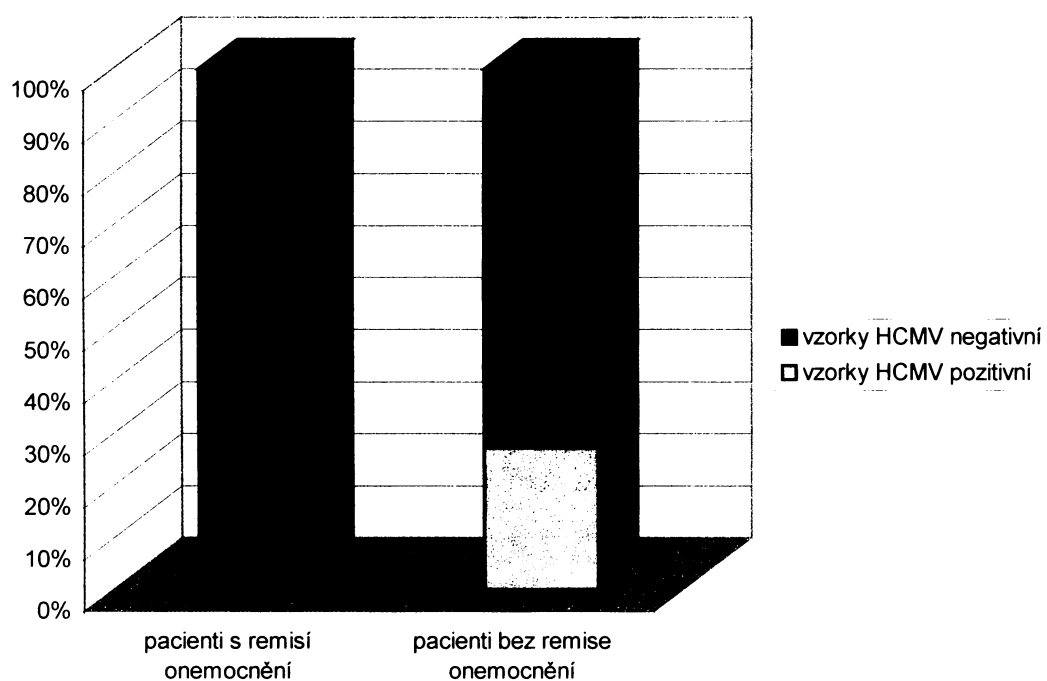


(tab.5)

skupina	vzorky HCMV pozitivní	vzorky HCMV negativní	celkem
Pacienti s remisí onemocnění	0	32	32
Pacienti bez remise onemocnění	3	8	11
celkem	3	40	43

Fisherův faktoriálový test: $p = 0,013$

(graf 2) Přítomnost HCMV v závislosti na stavu onemocnění



6. DISKUZE

Metodou real – time PCR jsme detekovali HCMV v některých nádorech dětského věku. Zastoupení virem infikovaných nádorů bylo 9,68 %, tedy nižší, než se uvádí pro HCMV v nádorech ve většině ostatních literárních pramenů. Různými imunologickými i molekulárně genetickými metodami byl HCMV detekován v 30 – 60% různých typech nádorů (Cinatl et al. 1996). Nejčastěji infikovanými nádory jsou adenokarcinomy kolorekta, maligní gliomy, Kaposiho sarkomy, karcinomy tlustého střeva, adenokarcinomy prostaty, karcinomy cervixu a speciálně v dětské onkologii pak neuroblastomy a Wilmsovy tumory.

Harkins ve své práci detekoval kombinací imunohistochemických metod, in situ hybridizace a PCR v 80% a 92% adenokarcinomech kolorekta HCMV virové proteiny IE1 – 72 a pp65 (Harkins et al. 2002). Cobbs prokázal se stoprocentní úspěšností HCMV přítomnost ve 27 vzorcích různých typů maligních gliomů (22x glioblastom, 1x oligoastrocytom grade III, 4x astrocytom grade II). U nezhoubné tkáně neprokázal HCMV ani v jednom případě (Cobbs et al. 2002).

Velké zastoupení HCMV bylo popsáno i u pacientů s rozvinutým onemocněním AIDS. HCMV infekce, která je jednou z častých příčin úmrtí těchto nemocných, byla diagnostikována u 90% pacientů s AIDS (Macher et al. 1983). Van der Berg různými metodami (in situ hybridizace, PCR a další) detekoval v nádorové tkáni Kaposiho sarkomu u 6 z 10 pacientů (60%) HCMV (Van der Berg et al. 1989).

Téměř třetinová přítomnost HCMV byla popsána i u Hodgkinsonova lymfomu. Huang pomocí PCR, in situ hybridizace a imunochemických metod detekoval HCMV ve 12 z 42 (28,6%) případech Hodgkinsonova lymfomu. Zajímavé je, že pouze v jednom případě byl v nádoru detekován jak HCMV tak EBV (předpokládané virové agens tohoto onemocnění). V ostatních případech se společný výskyt těchto dvou příbuzných virů nepotvrdil. Tento fakt by mohl poukazovat na transformační potenciál HCMV v EBV negativních Hodgkinsonových lymfomech (Huang et al. 2002).

HCMV byl také nalezen i u karcinomu cervixu, který je vyvolán papillomavirem. Nicméně procentuální zastoupení je nižší než u předchozích nádorů, tj. 9,5% (Chan et al. 2001) a 2 - 4% (Lanham et al. 2001).

Dosavadní studie nádorů dětského věku poukazují na nejvyšší procento HCMV pozitivní tkáně u neuroblastomu a Wilmsova tumoru (nefroblastom) (Rosenthal et al. 1993, Nigro et al. 1995). Vyšší frekvenci HCMV infekce v těchto dvou typech nádorů dětského věku jsme nepotvrdili. Z námi analyzovaných deseti neuroblastomů a dvou nefroblastomů jsme ani u jednoho neprokázali přítomnost HCMV. Stejně tak jsme neprokázali HCMV infekci ani u výše zmiňovaného Hodgkinova lymfomu a různých typů gliomů. Naopak jsme detekovali HCMV u nádorů, které nebývají tak často infikovány a sice po jednom případě u Ewingova sarkomu, germinálního nádoru mediastina a gastrointestinálního stromálního nádoru.

Rozdíl ve výskytu HCMV positivity mezi naší studií a literárními údaji lze vysvětlit citlivostí metody. Námi prováděná PCR v reálném čase byla schopna detekovat zhruba několik málo virových partikulí ve vzorku tkáně obsahujícím řádově 10^6 nádorových buněk. Některé metody, jako je například imunohistochemické vyšetření nebo in situ hybridizace, mohou být citlivější. Dalším možným vysvětlením může být doba odběru nádorového vzorku. Pokud byl vzorek odebírán po prodělané chemoterapii, mohla být HCMV aktivace vyvolána imunosupresí (Michálek a Horvath 2002). Naše vzorky nádorů byly s výjimkou nefroblastomu odebrány vždy před zahájením chemoterapie. U nefroblastomu je zahájena předoperační chemoterapie na základě průkazu nádoru ledviny zobrazovacími metodami (ultrasonografie a CT) a některých dalších kriterií (věk, stav pacienta). Dalším důvodem rozdílu mohou být i epidemiologické odlišnosti v různých zemích. Pokud je nám známo je tato studie první, která se zabývá průkazem HCMV v nádorech onkologických pacientů v Čechách, které jsou spádovou oblastí Kliniky dětské onkologie a hematologie Fakultní nemocnice v Motole.

Ani u jednoho z pacientů, u kterých jsme detekovali přítomnost HCMV v nádorové tkáni, se nezdařilo navodit dlouhodobější remisi onemocnění. Naopak dva pacienti již zemřeli, třetí je zatím ve stabilizovaném stavu s reziduem nádoru. Naproti tomu ani jednou jsme neprokázali HCMV u nádorových onemocnění, u nichž byla dosažena alespoň částečná remise onemocnění. Tento rozdíl jsme po vyhodnocení Fisherovým faktoriálovým testem mohli označit za významný ($p = 0,013$). Tato skutečnost opět naznačuje, že HCMV infekce nádorové tkáně může výrazně ovlivňovat chování nádoru v neprospěch pacienta, a to především posílením

rezistence nádorových buněk k chemoterapii. In vitro testy provedené na buněčných liniích neuroblastomových buněk tyto možnosti potvrzují (Cinatl et al. 1998).

Působení HCMV v nádorových buňkách je velmi komplikované, ale jistě podstatné pro chování celého nádoru. Buňky nakažené HCMV snáze odolávají chemoterapii, díky virovému blokování apoptózy (Skaletskaya 2001, McCormick 2003) a podpoře exprese antiapoptotických proteinů, jakým je např. Bcl-2 (Cinatl et al. 1998) nebo ΔN -p73 α (Allart 2002), a protoonkogenů c-myc a c-fos (Monick et al. 1992, Ghazal et al. 1993). Tím je zvýšena rezistence nádorových buněk vůči některým cytostatikům a k radioterapii. Dále napomáhá HCMV rozvoji onemocnění jak ve stádiu primárního nádoru, tak i při šíření onemocnění po těle – vzniku metastáz, v důsledku svého pozitivního vlivu na angiogenezi a motilitu nádorových buněk (Streblov et al. 2003, Scholz et al. 2000). Obecně se dá říci, že infekce HCMV mění vlastnosti nádoru v neprospěch nemocného a směrem ke zhoršení kurability. Tyto poznatky naznačují nové možnosti v léčbě některých nádorů, které na rozdíl od jiných dosud vzdorovaly terapii. Uvažuje se o možnosti zahájit klinickou studii s protivirovou terapií u rezistentních a recidivujících nádorů s přítomností HCMV (Činatl J jr. ústní sdělení, 2007).

7. ZÁVĚR

Analyzovali jsem 32 vzorků nádorové tkáně nádorů dětského věku. Ve třech případech se nám metodou real – time PCR podařilo detekovat HCMV. Jednalo se o typy nádorů, které v odborné literatuře nejsou označeny jako nádory často infikované HCMV. Ve 5 vzorcích krve a 15 vzorcích kostní dřeně jsme HCMV neprokázali ani jednou.

V ani jednom případě HCMV pozitivního nádoru se nejednalo o pacienta s onemocněním alespoň v částečné remisi, naopak dva HCMV pozitivní pacienti již na nádorové onemocnění zemřeli. V případech, kdy onemocnění je alespoň v částečné remisi, jsme HCMV nedetekovali ani jednou. Tento rozdíl byl statisticky významný.

Naše práce opět poukazuje na reálnou možnost ovlivnění nádorového onemocnění a jeho průběhu HCMV infekcí a tím zhoršení naděje nemocného na vyléčení.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998): *Základy buněčné biologie*. Espero publishing, Ústí nad labem, 297 - 303

Albrecht, T., Boldogh, I., Fons, M.P., Valyi-Nagy, T. (1993): Activation of proto-oncogenes and cell activation signals the initiation and progression of human cytomegalovirus infection. In Becker, Y., Darai, G., Huang, E.S (eds). (1993): *Molecular Aspects of Human Cytomegalovirus Diseases*. *Frontiers of Virology* 2: 384 – 411. Citováno podle Cinatl, J.jr., Cinatl, J., Vogel, J.U., Rabenau, H., Kornhuber, B., Doerr, H.W. (1996): Modulatory Effects of Human Cytomegalovirus Infection on Malignant Properties of Cancer Cells. *Intervirolgy* 39: 259 - 269

Allart, S., Martin, H., Détraves, C., Terrasson, J., Caput, D., Davrinche, C. (2002): Human Cytomegalovirus Induces Drug Resistance and Alteration of Programmed Cell Death by Accumulation of ΔN -p73 α^* . *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 29063 - 29068

Anděl, J. (1978): *Matematická statistika*. SNTL/ALFA, Praha

Baffis, V., Shrier, I., Sherker, A.H., Szilagyi, A. (1999): Use of Interferon for Prevention of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients with Hepatitis B or Hepatitis C Virus Infection. *Annals of Internal Medicine* 131: 696 - 701

Bernard, P.S., Wittwer, C.T. (2002): Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical chemistry* 48:1178 - 1185

Blaheta, R.A., Weich, E., Marian, D., Bereiter-Hahn, J., Jones, J., Jonas, D., Michaelis, M., Doerr, H.W., Cinatl, J.jr. (2006): Human Cytomegalovirus Infection Alters PC3 Prostate Carcinoma Cell Adhesion to Endothelial Cells and Extracellular Matrix. *Neoplasia* 8: 807 - 816

Butcher, S.J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B., Dargan, D.J. (1998): Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Journal of Structural Biology* 124: 70 - 76

Chan, P.K.S., Chan, M.Y.M., Li, W.W.H., Chan, D.P.C., Cheung, J.L.K., Cheng, A.F. (2001): Association of human β - herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *Journal of Clinical Pathology* 54: 48 - 53

Cinatl, J.jr., Cinatl, J., Vogel, J.U., Kotchetkov, R., Driever, P.H., Kabickova, H., Kornhuber, B., Schwabe, D., Doerr, H.W. (1998): Persistent Human Cytomegalovirus Infection Induces Drug Resistance and Alteration of Programmed Cell Death in Human Neuroblastoma Cells. *Cancer Research* 58: 367 – 372

Cinatl, J.jr., Cinatl, J., Vogel, J.U., Rabenau, H., Kornhuber, B., Doerr, H.W. (1996): Modulatory Effects of Human Cytomegalovirus Infection on Malignant Properties of Cancer Cells. *Intervirolgy* 39: 259 – 269

Cinatl, J.Jr., Kotchetkov, R., Scholz, M., Cinatl, J., Vogel, J.U., Driever, P.H., Doerr, H.W. (1999): Human Cytomegalovirus Infection Decreases Expression of Thrombospondin-1 Independent of the Tumor Suppressor Protein p53. *American journal of pathology* 155: 285 - 292

Cinatl, J., Scholz, M., Kotchetkov, R., Vogel, J.U., Doerr, H.W. (2004): Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends in Molecular Medicine* 10:19 – 23

Cobbs, C.S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G.Y., Bharara, S., King, P.H., Nabors, L.B., Cobbs, C.G., Britt, W.J. (2002): Human Cytomegalovirus Infection and Expression in Human Malignant Glioma. *Cancer Research* 62: 3347 – 3350

Cripe, T.P., Haugen, T.H., Turk, J.P., Tabatabai, F., Schmid, P.G., Dürst, M., Gissmann, L., Roman, A., Turek, L.P. (1987): Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *The EMBO Journal* 6: 3745 - 3753

Donà, M.G., Giorgi, C., Accardi, L. (2007): Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the Human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis. *BMC Cancer* 7: 25

Eckschlager, T. (1997): Germinální nádory. In Koutecký, J. a spolupracovníci: *Nádorová onemocnění dětí a mladistvých*. Karolinum, Praha, 200 - 204

Endo, K., Hirata, A., Iwai, K., Sakurai, M., Fukushi, M., Oie, M., Higuchi, M., Hall, W.W., Gejyo, F., Fujii, M. (2002): Human T-cell Leukemia Virus Type 2 (HTLV-2) Tax Protein Transforms a Rat Fibroblast Cell Line but Less Efficiently than HTLV-1 Tax. *Journal of Virology* 76: 2648 - 2653

Flint, S.J., et al. (2000): *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. ASM Press Washington, D.C.: 650 - 661

Gallo, R.C. (1985): The Human T-Cell Leukemia/Lymphotropic Retroviruses (HTLV) Family: Past, Present and Future. *Cancer Research* 45: 4524 - 4533

Ghazal, P., Nelson, J.A. (1993): Transcription factors and viral regulatory proteins as potential mediators of human cytomegalovirus pathogenesis. In Becker, Y., Darai, G., Huang, E.S. (1993)(eds): *Molecular Aspects of Human Cytomegalovirus Diseases*. *Frontiers of Virology* 2. Berlin, Springer: 360 – 383. Citováno podle: Cinatl, J.Jr., Cinatl, J., Vogel, J.U., Rabenau, H., Kornhuber, B., Doerr, H.W. (1996): Modulatory Effects of Human Cytomegalovirus Infection on Malignant Properties of Cancer Cells. *Intervirology* 39: 259 - 269

Ginzinger, D.G. (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology* 30: 503 - 512

Hamilton, J.D. (1982): *Cytomegalovirus and immunity*. Karger, Basel, New York:1 - 2

- Harkins, L. et al (2002): Specific localization of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *The Lancet* 360: 1557 – 1563
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996): Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986 - 994
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real – time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-30
- Huang, E.S., Boldogh, I., Mar, E.C. (1983): Human cytomegaloviruses: Evidence for possible association with human cancer. In Philips, L.A. (eds): *Viruses Associated with Human Cancer*. New York, Dekker, 161 – 194. Citováno podle: Cinatl, J.jr., Cinatl, J., Vogel, J.U., Rabenau, H., Kornhuber, B., Doerr, H.W. (1996): Modulatory Effects of Human Cytomegalovirus Infection on Malignant Properties of Cancer Cells. *Intervirology* 39: 259 - 269
- Huang, G., Yan, Q., Wang, Z., Chen, X., Zhang, X., Guo, Y., Li, J.J. (2002): Human cytomegalovirus in neoplastic cells of Epstein – Barr virus negative Hodgkin's disease. *International Journal of Oncology* 21: 31 – 36
- Hunninghake, G.W., Monick, M.M., Geist, L.J. (1999): Cytomegalovirus Infection, Regulation of Inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 150 - 152
- Inman, G.J., Farrell, P.J. (1995): Epstein–Barr virus EBNA – LP and transcription regulation properties of pRB, p107 and p53 in transfection assays. *Journal of General Virology* 76: 2141 - 2149
- Ishiji, T., Lace, M.J., Parkkinen, S., Anderson, R.D., Haugen, T.H., Cripe, T.P., Xiao, J.H., Davidson, I., Chambon, P., Turek, L.P. (1992): Transcriptional enhancer factor (TEF) – 1 and its cell-specific co-activator active human papillomavirus – 16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *The EMBO Journal* 11: 2271 - 2281
- Jebbink, J., Bai, X., Rogers, B.B., Dawson, D.B., Scheuermann, R.H., Domiati-Saad, R. (2003): Development of Real-Time PCR Assays for the Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus, Comparison of TaqMan Probes, and Molecular Beacons. *Journal of Molecular Diagnostics* 5: 15 - 20
- Jones, K.D., Aoki, Y., Chang, Y., Moore, P.S., Yarchoan, R., Tosato, G. (1999): Involvement of Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the Spontaneous Growth of Kaposi's Sarcoma Herpesvirus-Associated Infected Primary Effusion Lymphoma Cells. *Neoplasia* 94: 2871 - 2879
- Kaprálék, F. (2000): *Základy bakteriologie*. Karolinum, Praha: 11 - 14
- Kavan, P. (1997a): Hodgkinova choroba (maligní lymfogranulom). In Koutecký, J. a spolupracovníci: *Nádorová onemocnění dětí a mladistvých*. Karolinum, Praha, 144 - 149

- Kavan, P. (1997b): Non-Hodgkinské lymfomy. In Koutecký, J. a spolupracovníci: Nádorová onemocnění dětí a mladistvých. Karolinum, Praha, 150 – 156
- Kavan, P. (1997c): Sarkomy měkkých tkání (SMT). In Koutecký, J. a spolupracovníci: Nádorová onemocnění dětí a mladistvých. Karolinum, Praha 188 – 192
- Kibler, K.V., Jeang, K.T. (2001): CREB/ATF- Dependent Repression of Cyclin A by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein. *Journal of Virology* 75: 2161 – 2173
- Kolář, Z. et al (2003): Molekulární patologie nádorů. EPAVA, Olomouc
- Kolářová, M., Zavřelová, M., Beňa, F., Kolářová, L. (2000): Význam prevence infekcí v epidemiologii nádorů. *Klinická onkologie, zvláštní číslo*: 34 - 36
- Koutecký, J. a spolupracovníci (1997): Nádorová onemocnění dětí a mladistvých. Karolinum, Praha, 11 - 12
- Koutecký, J. a spolupracovníci (2004): *Klinická onkologie I*. Riopress, Praha ,33 - 39
- Kovacs, A., Weber, M.L., Burns, L.J., Jacob, H.S., Vercellotti, G.M. (1996): Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells. *American Journal of Pathology*. 149: 1531 - 1539
- Lanham, S., Herbert, A., Basarab, A., Watt, P. (2001): Detection of Cervical Infections in Colposcopy Clinic Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2946 - 2950
- Liang, T.J., Rehermann, B., Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H. (2000): Pathogenesis, Natural History, Treatment, and Prevention of Hepatitis C. *Annals of Internal Medicine* 132: 296 - 305
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S., Darnell, J. (2004): *Molecular cell biology*. W.H. Freeman and Company, New York, 5.vydání, 137 - 143
- Macher, A.M., Reichert, C.M., Strauss, S.E. et al (1983): Death in AIDS patients: role of cytomegalovirus. *N Engl J Med* 309: 1454 – 1457. Citováno podle Van der Berg, F., Schipper, M., Jiwa, M., Rook, R., Van der Rijke, F., Tigges, B. (1989): Implausibility of an aetiological association between cytomegalovirus and Kaposi's sarcoma by four techniques. *Journal of Clinical Pathology* 42: 128 - 131
- Mališ, J. (1997a): Nádory centrální nervové soustavy (CNS). In Koutecký, J. a spolupracovníci: Nádorová onemocnění dětí a mladistvých. Karolinum, Praha, 159 - 168
- Mališ, J. (1997b): Nefroblastom. In Koutecký, J. a spolupracovníci: Nádorová onemocnění dětí a mladistvých. Karolinum, Praha, 204 - 209

- Masood, R., Cesarman, E., Smith, D.L., Gill, P.S., Flore, O. (2002): Human Herpesvirus –8-Transformed Endothelial Cells Have Functionally Activated Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor. *American Journal of Pathology* 160: 23 - 29
- McCormick, A.L., Smith, V.L., Chow, D., Mocarski, E.S. (2003): Disruption of mitochondrial networks by the human cytomegalovirus UL37 gene product viral mitochondrion – localized inhibitor of apoptosis. *Journal of Virology* 77: 631 - 641
- Michálek, J., Horvath, R. (2002): High incidence of Epstein – Barr virus, cytomegalovirus and human herpesvirus 6 infections in children with cancer. *BMC Pediatrics* 2: 1
- Monick, M.M., Geist, L.J., Stinski, M.F., Hunninghake, G.W. (1992): The immediate early genes of human cytomegalovirus up-regulate expression of the cellular genes *myc* and *fos*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:251 - 256
- Muganda, P., Mendoza, O., Hernandez, J., Qian, Q. (1994): Human Cytomegalovirus Elevates Levels of the Cellular Protein p53 in Infected Fibroblasts. *Journal of Virology* 68: 8028 - 8034
- Nabors, L.B. Suswam, E., Huang, Y., Yang, X., Johnson, M.J., King, P.H. (2003): Tumor Necrosis Factor α Induces Angiogenic Factor Up-Regulation in Malignant Glioma Cells: A Role for RNA Stabilization and HuR. *Cancer Research*. 63:4181 – 4187
- Revello, M.G., Gerna, G. (2002): Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn infant. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 680 - 715
- Rosenthal, L.J., Chouhury, S. (1993): Potential oncogenicity of human cytomegalovirus. In Becker, Y., Darai, G., Huang, E.S. (eds): *Molecular aspects of human cytomegalovirus diseases. Frontiers of virology*. Berlin, Springer, vol. 2, 412 – 436. Citováno podle Cinatl, J.jr., Cinatl, J., Vogel, J.U., Rabenau, H., Kornhuber, B., Doerr, H.W. (1996): Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology* 39: 259 - 269
- Sáenz-Robles, M.T., Sullivan, C.S., Pipas, J.M. (2001): Transforming function of Simian virus 40. *Oncogene* 20: 7899 - 7907
- Samanta, M., Harkins, L., Klemm, K., Britt, W.J., Cobbs, C.S. (2003): High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *The Journal of Urology* 170: 998 - 1002
- Shinmura, Y., Kosugi, I., Kaneta, M., Tsutsui, Y. (1999): Migration of virus – infected neuronal cells in cerebral slice cultures of developing mouse brains after in vitro infection with murine cytomegalovirus. *Acta Neuropathology* 98: 590 – 596. Citováno podle Cinatl, J., Scholz, M., Kotchetkov, R., Vogel, J.U., Doerr, H.W. (2004): Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends in Molecular Medicine* 10:19 – 23

Scholz, M., Blaheta, R.A., Witting, B., Cinatl, J., Vogel, J.U., Doerr, H.W., Cinatl, J., Jr. (2000): Cytomegalovirus-infected neuroblastoma cells exhibit augmented invasiveness mediated by $\beta 1\alpha 5$ integrin (VLA-5). *Tissue antigens* 55: 412 – 421. Citováno podle Cinatl, J., Scholz, M., Kotchetkov, R., Vogel, J.U., Doerr, H.W. (2004): Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends in Molecular Medicine* 10:19 – 23

Schwartz, M.A. (1993): Signaling by Integrins: Implication for Tumorigenesis. *Cancer Research* 53: 1053 - 1056

Skaletskaya, A., Bartle, L.M., Chittenden, T., McCormick, A.L., Mocarski, E.S., Goldmacher, V.S. (2001): A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7829 - 7834

Speir, E., Modali, R., Huang, E.S., Leon, M.B., Shawl, F., Finkel, T., Epstein, S.E. (1994): Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science (Washington DC)* 265, 391 – 394

Streblow, D.N., Vomaske, J., Smith, P., Melnychuk, R., Hall, L., Pancheva, D., Smit, M., Casarosa, P., Schlaepfer, D.D., Nelson, J.A. (2003): Human Cytomegalovirus Chemokine Receptor US28-induced Smooth Muscle Cell Migration Is mediated by Focal Adhesion Kinase and Src. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 50456 - 50465

Šmelhaus, V. (1997a): Ewingův sarkom a periferní primitivní neuroektodermální nádor (PPNET). in Koutecký, J. a spolupracovníci: *Nádorová onemocnění dětí a mladistvých*. Karolinum, Praha, 177 - 187

Šmelhaus, V. (1997b): Neuroblastom. in Koutecký, J. a spolupracovníci: *Nádorová onemocnění dětí a mladistvých*. Karolinum, Praha. 171 – 177

Šmelhaus, V., Koutecký, J. (2003): Přehled pacientů kliniky dětské onkologie FN v Motole a vývoj výsledků jejich léčby v letech 1976 – 2000. *Klinická onkologie, supplement*: 85 - 92

Tyagi, S., Kramer, F.R. (1996): Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* , 303. Citováno podle Ginzinger DG (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology* 30: 503 - 512

Van der Berg, F., Schipper, M., Jiwa, M., Rook, R., Van de Rijke, F., Tigges, B. (1989): Implausibility of an aetiological association between cytomegalovirus and Kaposi's sarcoma by four techniques. *Journal of Clinical Pathology* 42: 128 - 131

Vilchez, R.A., Butel, S.J. (2004): Emergent Human Pathogen Simian virus 40 and Its Role in Cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 495 - 508

Wang, F., Gregory, C.D., Rowe, M., Rickinson, A.B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., Kieff, E. (1987): Epstein-Barr virus nuclear antigen 2

specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 84: 3452 - 3456

Wang, S., Rowe, M., Lundgren, E. (1996): Expression of the Epstein Barr Virus Transforming Protein LMP1 Causes a Rapid and Transient Stimulation of the BCL-2 Homologue Mcl-1 Levels in B-Cell Lines. *Cancer Research* 56: 4610 - 4613

Wagner, E.K., Hewlett, M.J. (2004): *Basic Virology*. Balckwell Publishing, Malden (USA), Oxford (UK), Carlton (Austrálie), 2.vydání, 356 - 376

Yasunaga, J.I., Matsuoka, M. (2007): Human T-Cell Leukemia Virus Type I Induces Adult T-Cell leukemia: From Clinical Aspects to Molecular Mechanisms. *Cancer Control* 14: 133 - 140

Yin, J.L., Shackel, N.A., Zekry, A. et al (2001): Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol cell biol* 79: 213. Citováno podle Ginzinger, D.G. (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology* 30: 503 - 512

Závada, V. (1999): *Molekulární virologie I*. Peres, Praha: 5 - 7, 111 - 132, 155 - 166

Zhu, H., Shen, Y., Shen, T. (1995): Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *Journal of Virology* 69, 7960 - 7970

zur Hausen, H. (2001): Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 20: 7820 - 7823