

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Humán herpesvírus-8 által okozott
emberi malignitások jellemzése**

Ötvös Rita

Témavezető: Dr. Kónya József



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A humán herpesvírus-8 felfedezése és taxonómiai besorolása	6
2.2. A humán herpesvírus-8 biológiai tulajdonságai	8
2.2.1. Morfológia és felépítés	8
2.2.2. A HHV-8 génjei	9
2.2.3. Tropismus	16
2.2.4. Epidemiológia és transzmisszió	17
2.2.5. A HHV-8 törzsek és elterjedésük	19
2.3. A humán herpesvírus onkogén hatása	22
2.3.1. A Kaposi sarcoma és kezelési lehetőségei	22
2.3.2. A testüregi B-sejtes lymphoma és kezelési lehetőségei	24
2.4. A daganatellenes kemoterápia fejlődése	26
2.4.1. Kezdetek	26
2.4.2. Citosztatikumok (citotoxikus szerek)	27
2.4.3. A citosztatikumok hatásmechanizmusa és mellékhatásaik	30
2.4.4. A jövő útja: in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálatok	31
2.5. Filogenetikai összefüggések kimutazása egyes vírus szubtypusok elterjedésének vizsgálatára	33
3. CÉLKITŰZÉSEK	36
4. ANYAGOK ÉS MÓGSZEREK	37
4.1. BCBL sejtvonalak gyógyszerérzékenységének vizsgálata	37
4.1.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülményeik	37
4.1.2. Gyógyszerek	39
4.1.3. Fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi teszt	41
4.2. Hazai HHV-8 törzsek filogenetikai vizsgálata	42
4.2.1. Klinikai minták	42
4.2.2. Sejtkultúra	42

4.2.3.	DNS preparálás paraffinba ágyazott metszetből	42
4.2.4.	PCR	43
4.2.5.	Oligonukelotidok	43
4.2.6.	A PCR mixek összetétele és reakció körülményeik	44
4.2.7.	Agaróz gélelektroforézis	44
4.2.8.	Szekvenálás	45
4.2.9.	Szekvencia és filogenetikai analízis	45
5.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	46
5.1.	A BCBL sejtvonalak gyógyszerérzékenységének vizsgálata	46
5.1.1.	A hatásos és hatástalan gyógyszerek kiválasztása	46
5.1.2.	Klaszteranalízis	50
5.1.3.	Farmakokinetikai összehasonlítás	51
5.1.4.	A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak érzékenységével kapcsolatos megállapítások	53
5.2.	Hazai HHV-8 törzsek filogenetikai vizsgálata	55
5.2.1.	HHV-8 pozitívitás vizsgálata orf26 PCR segítségével	55
5.2.2.	Az orf-K1 heminested PCR eredményei	56
5.2.3.	Az orf-K1 fragmentum szekvenálási eredménye	58
5.2.4.	Filogenetikai analízis	62
5.2.5.	K1 törzsek evolúciójával és eredetével kapcsolatos megállapítások	64
5.3.	Az értekezésben szereplő új eredmények	66
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	67
7.	SUMMARY	69
8.	IRODALOMJEGYZÉK	70
9.	TÁRGYSZAVAK	83
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84
	FÜGGELÉK	85
	A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista	85
	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	88

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (szerzett immunhiányos tünetegyüttes)
as	aminosav
AUC	Area under the curve (görbe alatti terület)
BCBL	Body cavity based lymphoma (testüregi B-sejtes lymphoma)
CHOP	Cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, prednisolon protokoll
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EBV	Epstein-Barr vírus
FCS	Fetal calf serum (borjúsavó)
FLICE	Fas associated death domain
FLIP	FLICE inhibitory protein
HDRT	High density replicator tool
HHV-8	Humán herpesvírus-8
HIV	Humán immundeficiencia vírus
IFA	Immunfluorescent assay (immunfluoreszcens vizsgálat)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KE	Killing effectiveness (ölési hatékonyság)
KS	Kaposi szarkóma
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus (Kaposi sarcoma-asszociált herpesvírus)
LANA	Latency associated nuclear antigens (látens nukleáris antigének)
LUR	Long unique region
MCD	Multicentrikus Castleman betegség
MCS	Mean cell survival
NF- κ B	Nukleáris faktor kappa B
nt	Nukleotid
orf	Open reading frame (nyílt leolvasási keret)
PBMC	Perifériás mononukleáris vérsejtek
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimeráz láncreakció
PEL	Primary effusion lymphoma
QAUC	Quotient of Area Under Curve
RB	Retinoblastoma fehérje
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBE	Tris-bórsav-EDTA puffer
TPA	12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate
TR	Termínális repetíció

1. BEVEZETÉS

A *Kaposi sarcoma* (KS) névadója Kaposi Mór, magyar származású bécsi bőrgyógyász, akinek a neve a szerzett immunhiányos állapot (AIDS) világjárvánnyal kapcsolatosan vált világszerte ismertté, jóllehet a *Kaposi sarcoma* HIV-fertőzés nélkül is előfordulhat. A KS patogenezisében bizonyítottan etiológiai szerepet játszik az 1994-ben Chang és munkatársai által molekuláris biológiai módszerrel felfedezett humán herpesvírus-8 (HHV-8), más elnevezéssel Kaposi szarkómához társult humán herpesvírus (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus - KSHV), mely a *Gamma-2 herpesvirinae* alcsalád Rhadinovirus genuszába tartozik. A HHV-8 a legújabban felismert emberi tumorvírus, mely a KS valamennyi megjelenési formájában (klasszikus - Kaposi által leírt, járványos - afrikai, iatrogén, illetve AIDS-hez társult) kimutatható, és bebizonyosodott, hogy ténylegesen onkogén hatású.

A HHV-8 etiológiai szereppel bír a ritka *testüregi B-sejtes lymphomákat* (BCBL – *body cavity B-cell lymphoma* vagy PEL- *primary effusion lymphoma*), illetve a *multicentrikus Castleman-betegséget* érintően is. A *testüregi B-sejtes lymphoma* prognózisa rossz, a legújabb publikációk 6 hónapnál rövidebb életkilátást feltételeznek. A daganatsejtek biológiai jellemzői, genetikai eltérések alapvetően befolyásolják a daganatok citosztatikum érzékenységet. A mai gyógyításban szigorú terápiás protokollokat követnek, bár lassan az individuális daganat-terápia veszi át az eddigi kezelési módok helyét. A testüregi B-sejtes lymphomából származó, *in vitro* kultúrában könnyen fenntartható sejtvonalak eredményesen használhatóak a HHV-8 vírus kutatásához, ugyanis látens episzómális formában hordozzák a vírust.

A vírus előfordulása az egészséges populációban igen változó és jellegzetes földrajzi megoszlást mutat, összehasonlítva más emberi herpesvírusokkal - a HHV-8 szeroprevalenciája 5-35% az általános népesség körében – alacsonynak számít. Alacsony szintű a prevalencia Észak-Amerikában, Ázsiában, Észak- és Nyugat-Európában (0-5%), közepes szintű a mediterrán országokban, különösen Olaszországban és Görögországban, valamint Izraelben (5-25%) és széles körben elterjedt Afrika számos részén (50-87%). Egyének között, valamint egy adott földrajzi területen élő populációk között is eltérő az

előfordulása. A HHV-8 sokkal gyakoribb a nyugati országokban a HIV-fertőzöttek, a homoszexuális férfiak körében, valamint az intravénás kábítószer-használók között.

A HHV-8 genom adott hipervariábilis régiójának szignifikáns szekvencia és hossz variabilitása alapján a 7 fő szubtípus különíthető el: A, B, C, D, E, F és Z. A HHV-8 törzsek variánsainak megoszlása függ földrajzi és etnikai hovatartozástól is.

Jelen munkámban a HHV-8 törzsek filogenetikai vizsgálatával kerestem a választ arra, hogy Magyarországon mely variánsok mutathatóak ki. KS biopszia mintákat analizáltunk a hipervariábilis régiók PCR amplifikációját követő szekvenálással.

Valamint vizsgálni kívántuk a testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak in vitro gyógyszerérzékenységét egy speciális gyógyszerérzékenységi teszt segítségével. A klinikumban is használt citosztatikum között eddig még nem használt in vitro hatásosnak bizonyuló gyógyszereket kerestünk, mely a jelen alkalmazott terápiás protokoll továbbfejlesztése.

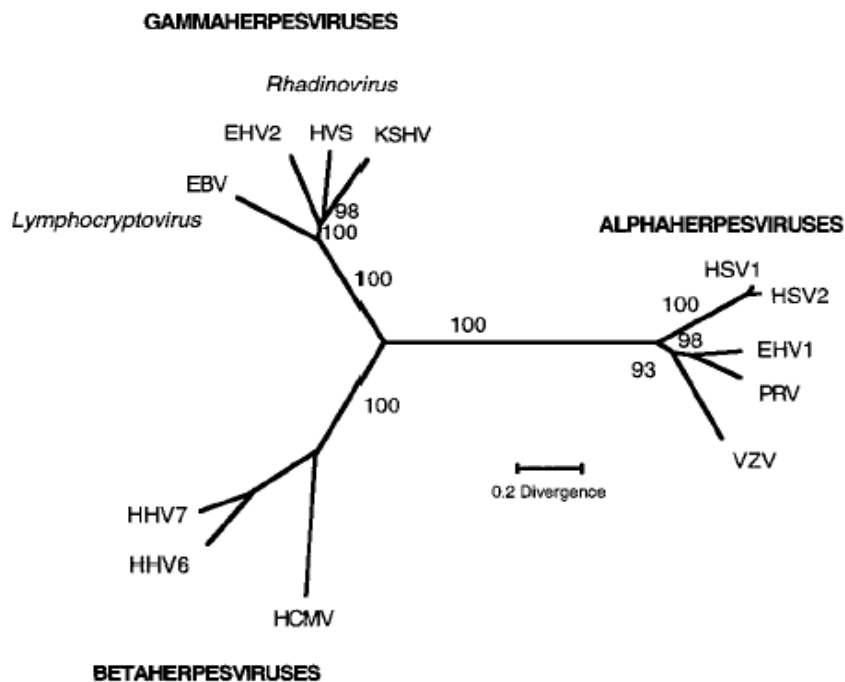
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A humán herpesvírus-8 felfedezése és taxonómiai besorolása

Több mint harminc évvel ezelőtt herpesvírus-szerű partikulákat figyeltek meg KS betegek szövettényeleteiben, melyeket akkor cytomegalovírusnak gondoltak [1], [2]. 1994-ben Patrick Moore epidemiológus és Yuan Chang molekuláris biológus kutatók vírus eredetű DNS-szekvenciákat találtak KS betegek bőrbioptizás szövetmintáiban reprezentációs differencia analízis (RDA) segítségével, ezeket az egészséges szövetekben nem tudták kimutatni [3]. A vírust Kaposi sarcoma-asszociált herpesvírusnak (Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus, KSHV), később humán herpesvírus 8-nak (HHV-8) nevezték el.

A vírust *HIV/AIDS-hez társuló testüregi B-sejtes lymphomák* esetén (*Body-cavity-based lymphoma*, BCBL vagy *primary effusion lymphoma*, PEL) is megtalálták az Epstein-Barr vírussal (EBV) együtt [4], azonban néhány esetben csak a HHV-8-at sikerült kimutatni, ezért feltételezték direkt sejtranzformáló hatását. Kimutatták a HHV-8-at *multicentrikus Castleman-betegségben* (MCD, ritka, atípusos lymphoproliferatív elváltozás, amelyet vascularis hyperplasia kísér) [5], valamint *myeloma multiplexes és benignus monoklonális gammopathiás* betegek néhány csontvelőmintájában is [6]. Igazolták a HHV-8-DNS jelenlétét HIV-negatív angiosarcomás betegek tumorszövetében, továbbá *eosinophiliával járó angiolymphoid hyperplasiában* is [7].

A HHV-8 DNS szekvenciája alapján kimutatható közeli rokonsága az Epstein-Barr vírussal (EBV), két mókusmajom vírussal (herpesvirus saimiri, HVS) és rhesus rhadinovirussal (RRV), valamint egy egér herpesvírussal (murin gammaherpesvirus 68, MHV68) [8], [9], [10]. Ennek alapján a vírust a gamma-2 herpesvirinae alcsalád Rhadinovírus genuszába sorolták (1. ábra). Az 1. táblázatban a herpesviridae család emberre ártalmas fajainak összefoglalása látható.



1. ábra. A herpesvírusok törzsfája az orf25 (MCP) gén termékének aminosav szekvenciája alapján [11].

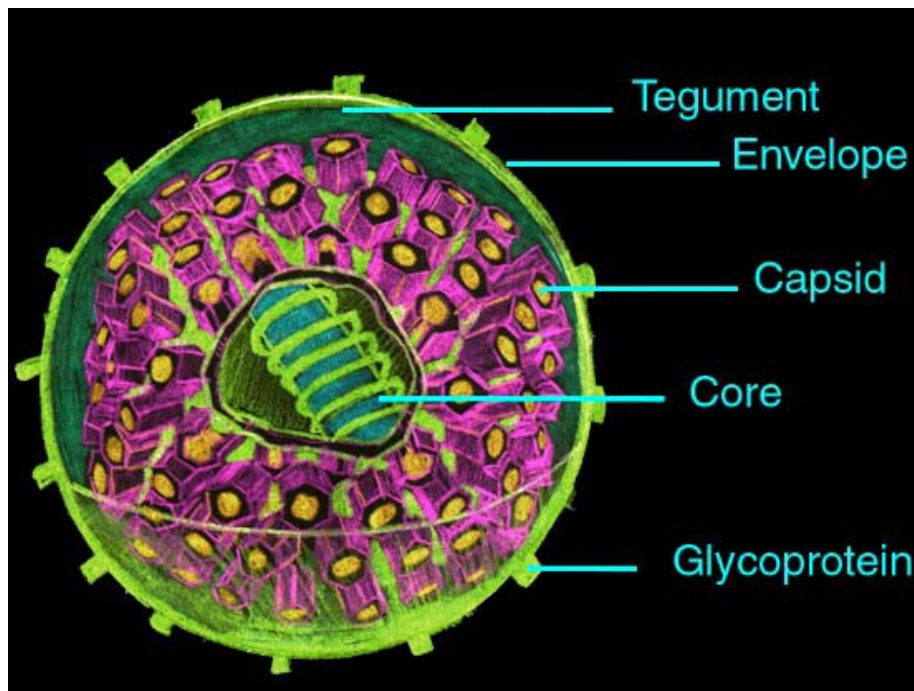
1. táblázat. A *Herpesviridae* család humán patogén fajai [12].

Herpesviridae család	Genusz	Faj	Formális név
Alfa-herpesvirinae	Simplex vírus	Herpes simplex vírus 1 (HSV-1)	HHV-1
		Herpes simplex vírus 2 (HSV-2)	HHV-2
Béta-herpesvirinae	Cytomegalovírus	Cytomegalovírus (CMV)	HHV-5
	Roseolovírus	Humán herpesvírus 6 (HHV-6)	HHV-6
Gamma-herpesvirinae	Lymphocryptovírus (gamma-1)	Epstein-Barr vírus (EBV)	HHV-4
	Rhadinovírus (gamma-2)	Kaposi-sarcoma asszociált herpesvírus (KSHV)	HHV-8

2.2 A humán herpesvírus-8 biológiai tulajdonságai

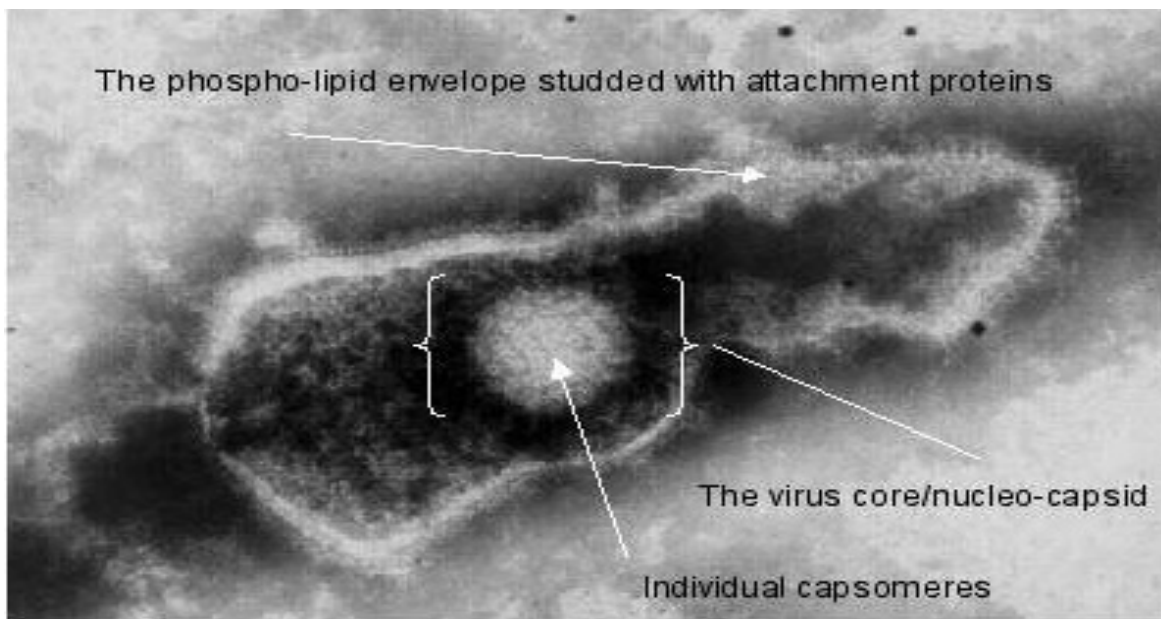
2.2.1 Morfológia és felépítés

A virion morfológiailag a többi herpesvírushoz hasonló, 162 kapszomerből álló ikozahedrális kapsziddal rendelkezik, melyet az amorf tegumentum állomány vesz körül és legkívül a peplon borít. Mérete körülbelül 140 nm (2. ábra) [2].



2. ábra. A HHV-8 felépítése (forrás: <http://bioinformatica.upf.edu/2004/projectes04/3.8.1/webtrabajo.html>)

Genomja (core) lineáris, duplaszálú DNS, mely 165-170 kilobázis hosszúságú [13]. A nukleokapszidok (elektrokondez maggal) az indukált sejtek magjaiban, a már burokkal rendelkező virionok a citoplazmában találhatók (3. ábra) [14].

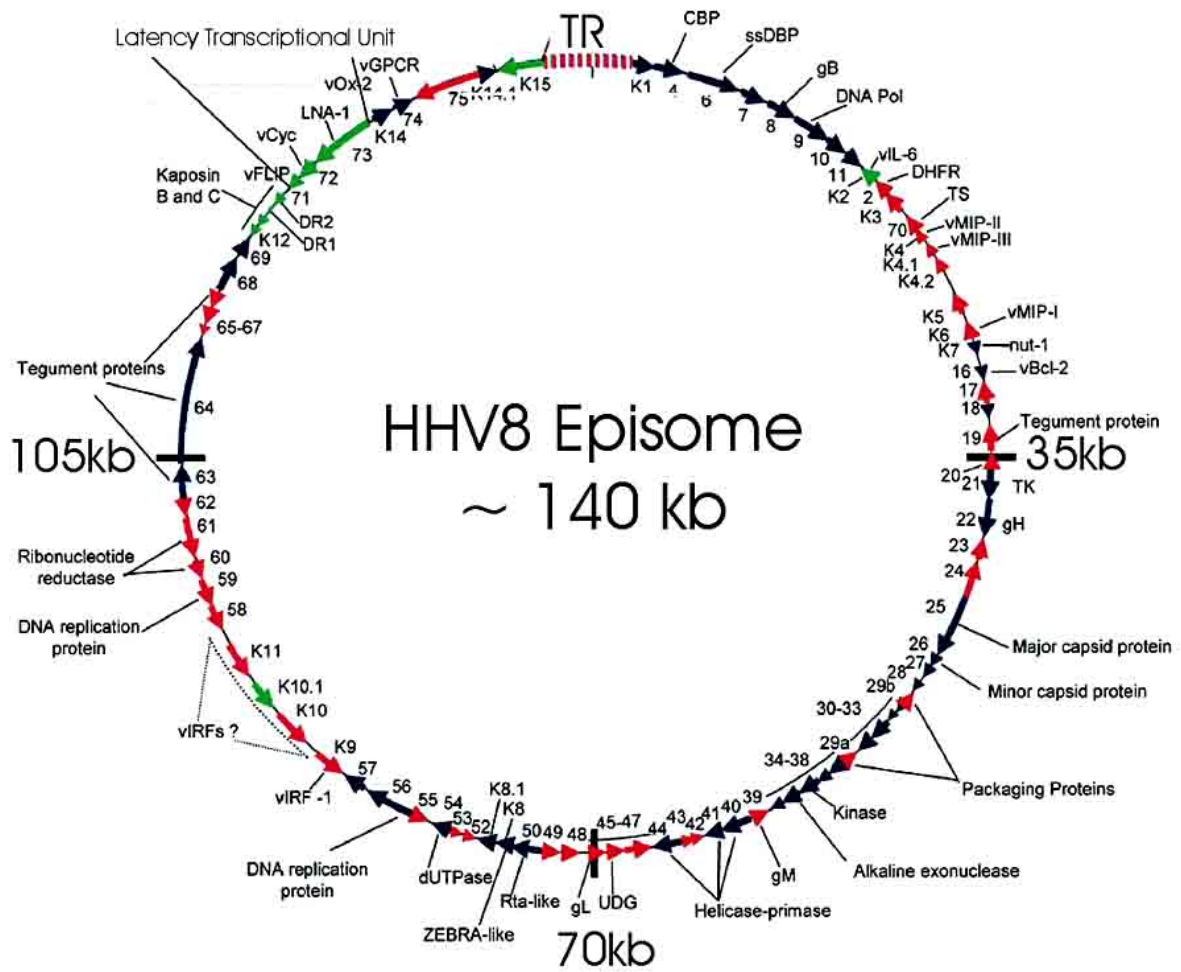


3. ábra. A HHV-8 negatív kontrasztos elektronmikroszkópikus képe
(forrás: <http://teaching.ncl.ac.uk/>)

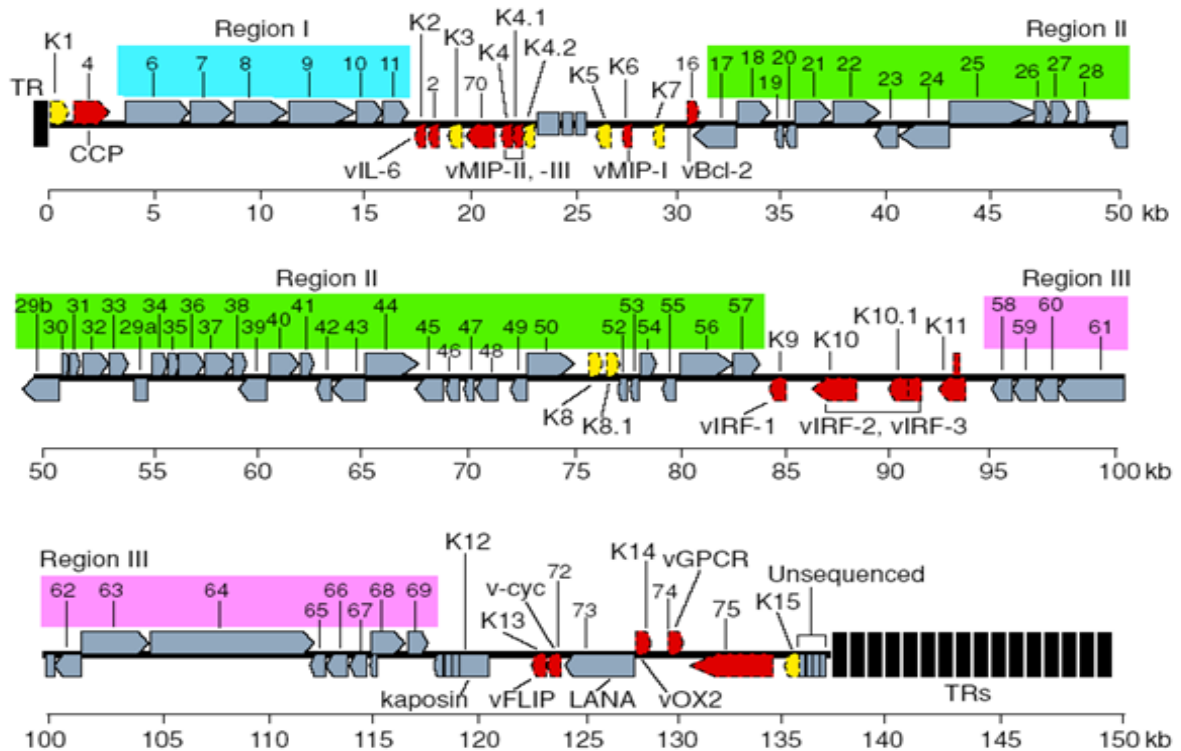
2.2.2 A HHV-8 génjei

A HHV-8 genomja egy központi, 145 kb hosszúságú „long unique” szakaszból (LUR) áll (54% GC tartalom), melyet kétoldalt több, ismétlődő, körülbelül 801 bp hosszúságú, 85% GC tartalmú terminális repeat (TR) szakaszok határolnak, mely szakaszok száma izolátumonként változó (16-75). A LUR legnagyobb belső része genetikailag nagymértékben konzervált, mindössze 0,1%-os variabilitást írtak le. A genom struktúrája a többi rhadinovírus genomjához hasonló. Látens fertőzés alatt a vírus a sejtmagban cirkuláris episzomális DNS több kópiájában marad fenn (4. ábra), a lítikus replikáció alatt a DNS lineáris. (5. ábra). A vírus kb. 90 génje közül körülbelül 15 egyedi (K1-15), de több mint 60 homológiát mutat más rhadinovírusokkal. A gének közül 25 kódol olyan proteint, melyek más herpesvírusokban nem léteznek. A HHV-8-ban nem találhatóak meg sem a HVS (herpesvirus saimiri, a gazda mókusmajomban nem patogén, de más főemlősökben poliklonális malignus T-sejt limfómákat okoz), sem az EBV transzformáló génjei. Azonban a HHV-8 - mint más rhadinovírusok is - legalább 14 olyan gént is hordoz, melyek celluláris gének homológjai, ezek képesek a sejtproliferáció szabályozására. A

rhadinovírusokban ezek a különböző gazdasejt-gének a genom hasonló helyein találhatóak [15-17].



4. ábra. A HHV-8 cirkuláris genomja, TR: terminális repeat régió (Forrás: <http://www.bioscience.org>)



5. ábra. A HHV-8 lineáris genomja (Forrás: <http://laszlo.mtc.ki.se/>)

Mint minden herpesvírusra, a HHV-8-ra is jellemző a látens (nem produktív) és a lítikus (produktív vagy replikatív) életciklus, melyek alapján a HHV-8 gének is elkülöníthetők [2, 6].

A primer infekciót követően a HHV-8 hosszú életidejű memória B-sejtekben perzisztál, a HHV-8 genomot cirkuláris episzómális formában hordozzák a sejtmagban [18, 19]. A HHV-8 látens génjei indukálják a sejtnövekedést és a fertőzött tumorsejtekben gátolják az apoptózist. Ezek TPA-val (12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), sodium-butyrate-tal és inomycinnel *in vitro* indukálhatóak [2, 6, 20]. A lítikus fázisban a virális genomok replikálódnak, fertőző virion termelnek és több mint 80 lítikus virális gén fejeződik ki, amely majd a sejt lízisével jár együtt (lítikus ciklus elnevezése) [21]. A KS lézióban jelenlévő monocyta eredetű sejtekben és az orsósejtek 2-5%-ában lítikus ciklus fordul elő, MCD-nél gyakori, BCBL-sejtekben ritkán található meg [22]. A HHV-8 patogenezisében mind a látens és a lítikus gének szerepet játszanak, de az onkogenézis szempontjából a látens fertőzések fontosabbnak tűnnek. Habár a látencia alatt csupán néhány szakasz

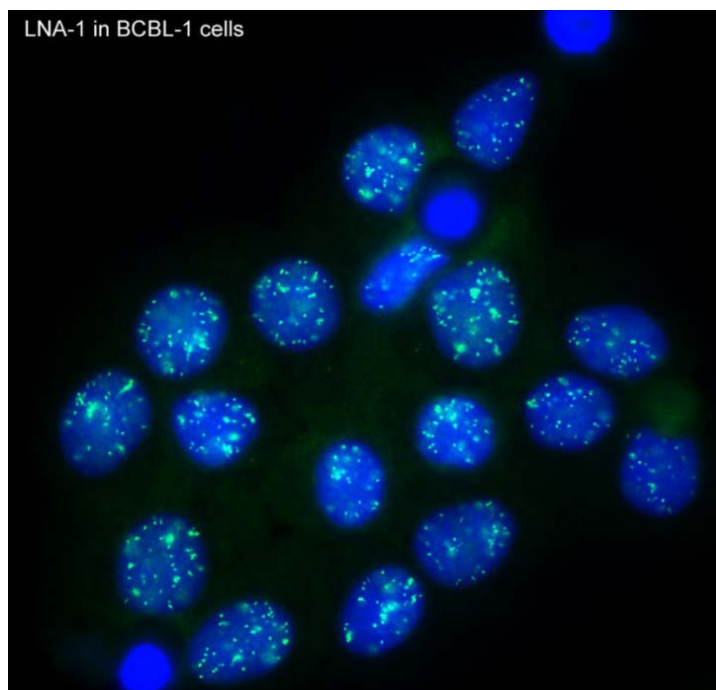
transzkripciósan aktív, KS tumorokban az orsósejtek 98%-a kizárólag látens transzkripteket expresszál [2]. A KS léziókban a sejtek körülbelül 5%-ában detektálhatóak lítikus transzkriptek. Ezek a sejtek pusztulásra vannak ítélve, így nem szerepelnek a lézió proliferáló sejthányadában. Azonban a jelenlegi kutatások szerint ezek a lítikus sejtek elősegítik a KS tumor fejlődését néhány szinergikus mechanizmuson keresztül: parakrin hatással bírnak a környezetükben levő többi sejtre, segítik a vírus terjedését új cél sejtekre, és szerepük van a HHV-8 kódolt angiogenezisben [2].

A következőkben néhány fontosabb látens és lítikus gén szerepét tekintem át a HHV-8 onkogenezisében.

Látens gének

Orf73/LNA-1/LANA-1: az 1.162 aminosavból álló, nagy molekulású látencia-asszociált nukleáris antigént (LNA-1 vagy LANA-1) kódolja [8]. Nincs felismerhető celluláris homológja a vírusok között és multifunkcionális szerepet tölt be a HHV-8 fertőzésében és patogenezisében. Egyrészt esszenciális szerepet játszik a látencia ideje alatt, a virális epizómális DNS-t a terminális régióval megköti és a gazdasejt kromoszómához kapcsolja a mitózis során [23]. Másrészt a virális és a gazdasejt génexpressziót szabályozza (aktiválja és gátolja virális és celluláris gének expresszióját), számos transzkripciót szabályozó celluláris proteint köt (például pRb, retinoblastoma protein, neutralizálja a tumorszupresszor hatását), továbbá a p53 tumor szupresszor fehérjével is kapcsolatban áll (a p53 potens transzkripciót a LANA képes gátolni) [24], [25]. Valamint aktiválja a humán telomeráz reverz transzkriptáz promotert [23].

A LANA-1 antigén könnyen kimutatható immunohisztokémia és immunofluoreszcens vizsgálatokkal (IFA), ugyanis jellegzetesen pöttyös mintázatot mutat a sejtmagon belül [26] (5. ábra).



6. ábra. BCBL-1 sejtek anti-HHV-8 LANA-val való reakciója

(Forrás: <http://laszlo.mtc.ki.se/>)

A LANA a KS orsó sejteinek korai és késői szakaszában is expresszálódik az összes klinikai forma esetén [26], [27]. Számos tanulmány igazolja a LANA-1 pozitív sejtek növekedését a KS lézió progressziója alatt [28], [29]. Ezen granulátumok száma változó klinikai formánként és nemenként, mely lehetővé teszi a HHV-8 infekció detektálását és kvantifikálását a KS léziókban [29]. Ezek alapján a HHV-8 LANA IFA analízist prognosztikai és nyomonkövetési célból is fel lehet használni (6. ábra).

HHV-8 K13/vFLIP: az orf K13 által kódolt virális FLIP gén, a FADD (Fas-asszociált domén) mediált apoptózist gátolja és a kaspáz 3, 8 és 9 proteáz aktivitását blokkolja [2] [30]. A NF- κ B transzkripció faktort aktiválja. A vFLIP ezen két anti-apoptotikus hatása a *Kaposi sarcoma* esetében a tumorsejtek védelmét szolgálhatja a sejtes immunitás effektor sejteivel szemben, és így a HHV-8 a daganatnövekedés progressziójához járul hozzá [31].

HHV-8 ORF72/vCyclin: a 257 aminosavból álló vCyclint (vCYC, K-Cyclin, vCyclin-D) az orf72 kódolja, mely 54% homológiát mutat a virális cyclin D2-vel, és a G1-S fázis átmenetét kontrollálja (gátolja az S-fázisba lépést) a CDK4 és CDK6 komplex

képződésével, amely képes az Rb fehérje inaktiválására annak foszforilálásával, amely így már nem képes az E2F transzkripciós faktorok megkötésére [2]. A vCyclin a normális sejtciklus szabályozásának megzavarásával hozzájárul a fokozott sejtproliferációhoz és a KS kialakulásához [32].

K10.5/LANA-2: a LANA-2 protein (vIRF-3), a p53-mediálta transzaktivációt és apoptózist gátolja. Csak BCBL és MCD asszociált malignus B-sejtekben expresszálódik, KS tumorokban nem [2] [33].

K15/LAMP: látencia-asszociált membrán proteint kódol, mely citoplazmatikus doménje SH2 motívumot és TRAF (tumor nekrozis faktor receptor-asszociált faktor) kötőhelyet tartalmaz [2].

K12/Kaposin: az orf12-ről átíródó fehérje nagy mennyiségben van jelen a KS és BCBL szöveteiben (in situ hibridizációval detektálható) és a lítikus replikációt indukálja. A kaposin fehérjének 3 különböző izoformája ismert (A, B és C), melyek ugyanarról a helyről transzlálódnak [2]. A kaposin A-t sejtkultúrába transzformálva, majd nude egerekbe rakva tumorigenezis indul el [34]. A kaposin B minden HHV-8 fertőzött sejtben kimutatható, mely aktiválja a p38 mitogén aktiválta protein kináz (MAPK)-MK2 útvonalat és blokkolja a citokin mRNS pusztulást [35].

K11.5/vIRF-2: gátolja a dsRNS protein kináz (PKR) autofoszforilációját, ezáltal az NF- κ B transzaktivátort és az apoptózist [2].

Lítikus gének

K2/vIL-6: a 204 aminosavból álló virális interleukin-6 (vIL-6) proteint kódolja, amely a humán IL-6 proteinhez 24% homológiát mutat, és annak termelését indukálja [15]. Anti-apoptotikus és növekedés-serkentő hatású a lymphocitákra, BCBL-ben autokrin növekedési faktorként szolgál [2]. Elsősorban MCD és BCBL B-sejteiben expresszálódik, míg KS szövetekben ritkán [36].

ORF74/vGCPR: az IL-8 receptor homológja, mely a virális G-protein-coupled receptor fehérjét kódolja [2]. Az angiogenezisben vesz részt, számos citokint és növekedési faktort indukál autokrin és parakrin módon (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, GM-CSF, VEGF, bFGF, MCP-1) [17].

K9/vIRF-1 és K10.5/K10.6/vIRF-3: virális interferon szabályozó faktorokat (vIRF1-4) kódolnak [2]. Nude egerekben tumorigenetikus és apoptózist indukál. A p53 fehérjét köti, megakadályozza annak foszforilását és acetilálását, így gátolja a p53-függő és az interferon indukált transzkripciót és programozott sejthalált [36].

K1: A genom 5' végén található első gén, mely 279-289 aminosavat tartalmazó transzmembrán glikoproteint kódol cisztein gazdag extracelluláris doménnel és 35-43 aminosavból álló citoplazmatikus farokkal. A különböző vírusizolátumok között szekvencia és hossz variációk vannak, melyek alapján filogenetikai vizsgálatok végezhetőek el. Ezen eltérések ellenére minden K1 fehérje funkcionálisan hasonló. A K1 aktiválja a PI3-AKT anti-apoptotikus jelátviteli utat, különböző túlélő faktorokat indukál (pl. VEGF, melynek autokrin és parakrin szerepe is van). A K1 szupresszálja a Fas receptor mediálta apoptózist. E lítikus virális fehérje fő szerepe az apoptózis gátlása, késlelteti a sejthalált a lítikus replikáció idején, így biztosítva az időt a virionok gyártására és összerakására a sejtlízis előtt [2], [37], [38].

K7/vIAP: a K7 gén terméke egy 19-21 kDa glikoprotein, a survivin-delta Ex3 celluláris fehérjének homológja, mely a mitokondriális membránokon lokalizálódik és megvédi a sejteket az apoptózistól [2].

ORF26: a 34 kDa minor kapszid proteint kódolja. PCR tesztekben az erre a régióra tervezett primerek használata a legáltalánosabban elterjedt és a legszenzitívebbnek bizonyuló diagnosztikai eljárás a HHV-8 kimutatására [16].

ORF K8.1/gp35-37: késő lítikus gén, melynek 3 transzkriptjét mutatták ki TPA-indukált BCBL-1 sejtekből RT-PCR-rel (K8.1 α , K8.1 β , K8.1 γ). A K8.1 γ unspliced transzkript, a K8.1 α transzkript 167 as hosszúságú. Feltehetően a K8.1 β spliced transzkript kódolja a gp35-37 envelope glikoproteint, mely szerin és treonin gazdag, és erősen immunreaktív. Ezt a 35-37 kDa polipeptidet az indukált BCBL-1 sejtek nagy mennyiségben expresszálják. A K8.1 a fertőzött sejtek citoplazmamembránján és a már sejtől kijutott virionok felszínén lokalizálódik. A K8.1 N-terminális része a fertőzött sejtek és a virionok membránján kívül van (extracelluláris domén). Feltehetőleg a sejtől való kijutás során a virionok K8.1 proteinjének jelenléte szükséges a sejtmembrán felszínére. Egyéb herpesvírusokkal nem ad keresztreakciót, így a KS betegek szérumainak Western-blot vizsgálatával ezen fehérje a

leggyakrabban kimutatható, így a K8.1/gp35-37 antigén kiválóan alkalmazható szerológiai tesztekben [39], [40].

HHV-8 mikroRNS-ek: kis, nem kódoló RNS molekulákat (microRNS, miRNA) azonosítottak a HHV-8-ban, melyek gének expresszióját szabályozzák a komplementer messenger RNS-éhez kötődve [41]. A HHV-8 miRNS a kaposin gén (ORF K12) szakaszára korlátozódik, melyet az orsósejtek expresszálnak a KS minden stádiumában és képes a fertőzött sejtekben daganatkeltő átalakulást indukálni [42]. A HHV-8 miRNS-t szabályozó virális és celluláris gének még azonosításra várnak.

2.2.3 Tropismus

A HHV-8 főleg endothel sejtekben és B-lymphocitákban található, melyeket látenszen fertőz, de kimutatták perifériás mononukleáris sejtekben (például Közép-Afrikában endémiás *Kaposi sarcoma* esetében) is [43].

A vírus előfordul mind a négyféle *Kaposi sarcoma*-ban a KS léziók endothel- és orsó -sejtjeiben (KS endotheliális tumorsejtek) [44]. KS léziókban a vírus cirkuláris formáját és lítikus gének (orf25, orf26) mRNS expresszióját is kimutatták. Perifériás vér mononukleáris sejtjeiben mind a cirkuláris, mind a lineáris HHV-8 genomot detektálták, mely a produktív fertőzött sejtek jelenlétét igazolja [16] [45]. A lítikus HHV-8 gének expresszióját igazolták monocytákban/makrofágokban is. A keringő monocyták a vírust a szövetekbe juttatják, ahol gyulladáshoz vezető citokinek hatására lítikus replikáció megy végbe, és így a vírus a szomszédos sejteket is megfertőzi, melyek makrofágokká és orsósejtes endotheliális makrofágokká differenciálódnak, melyek a vírust látenszen hordozzák [22].

A vírus reaktiváció során a HHV-8 minden keringő sejtet megfertőz: kimutatták B-sejtben, CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtben, makrofágokban.

A HHV-8 DNS-t kimutatták nyálban és légúti váladékokban AIDS-hez társult KS betegek 37-76%-ánál, HIV-fertőzött KS betegek szájüregi szövetmintáinak 71%-ában [46]. Ezek az adatok megerősítik, hogy a HHV-8 szaporodhat az oropharynx szöveiben (epithel sejtekben) és nyállal átvihető lehet.

A vírust kimutatták KS-ás betegek spermájában és prostata glandularis epitheliumában [47] [48].

A BCBL-sejtek és a KS-szövet sejtjeinek többsége látenszen fertőzött a HHV-8-cal (cirkuláris genom), azonban a sejtek egy része (5-10%-a) lítikusan fertőzött. KS lézió sejtjeiben elektronmikroszkóppal HHV-8 virionok figyelhetők meg. MCD sejtekben látens és lítikus gének is expresszálódnak.

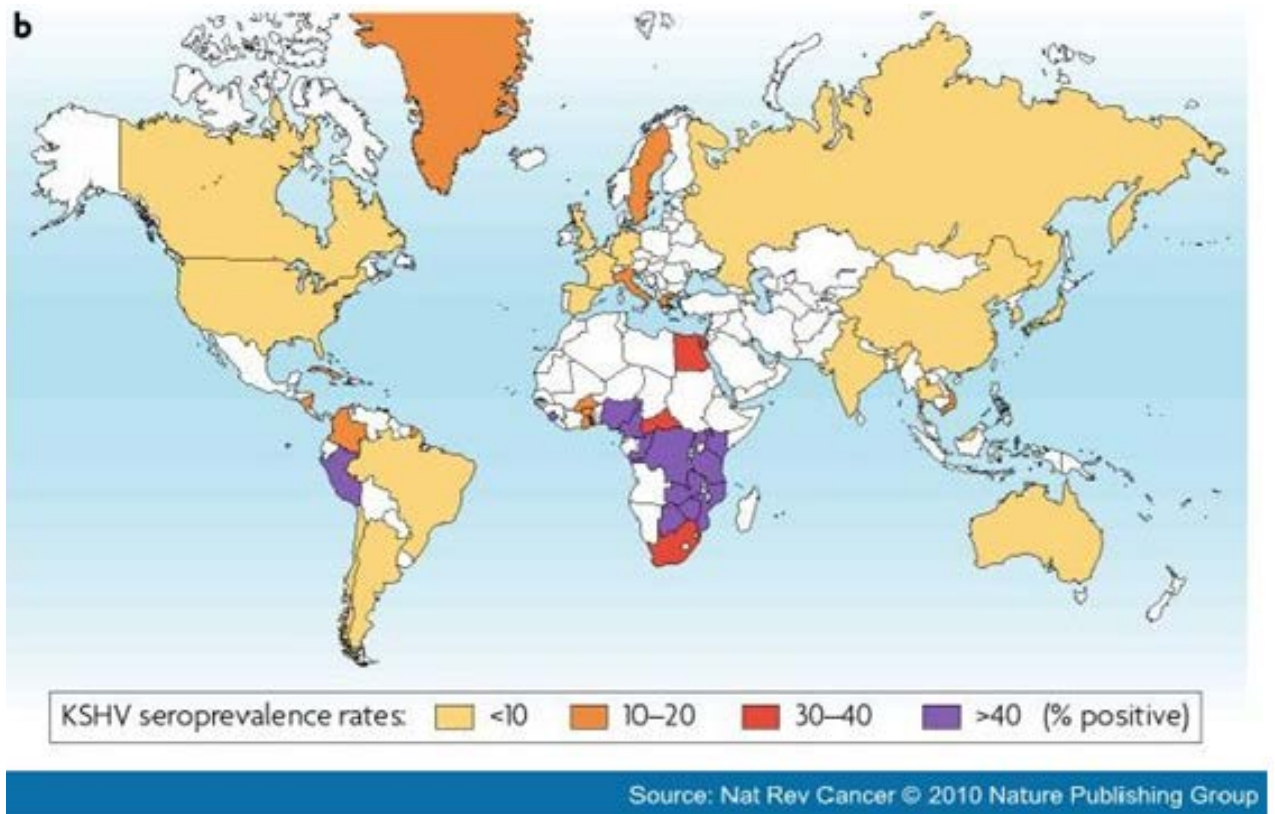
2.2.4. Epidemiológia és transzmisszió

A vírus előfordulása az egészséges populációban igen változó és jellegzetes földrajzi eloszlást mutat [49] (7. ábra). A legmagasabb az előfordulási arány a szub-szaharai Afrika területén (30-70%). Viszonylag magas vagy közepes Dél-Olaszországban (5-25%) és más mediterrán területeken [50]. Több, mint 30% Szicília és Szardínia területén [51]. Alacsony szintű Észak-Európában, Ázsiában és az USA-ban. A HHV-8 fertőzés prevalenciája Európában északról délre haladva nő, továbbá összefüggést mutat a KS incidenciájával [52], [53]. Ezzel ellentétben a brazil indiánok körében a HHV-8 fertőzés hiperendémias (53%), ám a KS incidenciája alacsony [54]. Ecuadori indiánok izolált populációjában még magasabb, 63-100%-os a prevalencia [55].

Afrikában a KS már a HIV járvány kitörése előtt gyakori volt, utána pedig 20-szor több eset fordult elő bizonyos országokban (pl. Uganda, Zimbabwe, Dél-Afrika), így a férfiaknál az első, a nőknél a második leggyakoribb daganatos megbetegedéssé vált. Dél-Afrikában 2006-ra a KS-ás férfiak/nők aránya 2:1 lett az 1988-as 7:1 arányhoz képest.

A HHV-8 szeroprevalencia magas és az életkorral nő, magasabb ellenanyag titer esetén nagyobb a KS kockázata, továbbá a HIV-szeropozitívok esetében nagyobb a kockázat, mint szeronegatívokban [56]. A HIV pozitív homoszexuális férfiak csoportjában a normál populációnál magasabb szeroprevalenciáját mutatták ki kora szero-epidemiológiai vizsgálatok, mely a vírus szexuális úton való terjedésére irányította a figyelmet. Az USA-ban a homoszexuális férfiak között a KSHV szeroprevalenciája szoros összefüggést mutatott a promiszkuitással, bizonyos szexuális viselkedési formákkal és korábbi szexuális úton terjedő betegségek előfordulásával [57]. A homoszexuális férfiak fokozott rizikója

számos fertőzésben (HIV, HHV-8, gonorrhoea,) szerepe van az anális közösülésnek, sem az anus laphámja, sem a rectum hengerhámja, sem a lamina propria szerkezete nem fizikai behatások elviselésére fejlődött ki az evolúció során. A könnyen sérülő terület fertőzések ideális behatolási kapuja.



7. ábra. A vírus előfordulása a Földön

(Forrás: <http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n10/full/nrc2888.html>)

A HHV-8 endémiás területeken a non-szexuális terjedési mód dominál, amelyben szerepet játszik a szoros kontaktus (anyáról gyermekre: anyai méhben, szülés, szoptatás, valamint családon belüli terjedés). Számos tanulmány írta le, hogy a HHV-8 pozitív anyák gyermekei nagyobb valószínűséggel lesznek HHV-8 fertőzöttek, mint a HHV-8 negatív anyák gyerekei [58], bár más szerzők ilyen összefüggést nem igazoltak [59]. Azonban újabb vizsgálatok mégis ennek a lehetőségét erősítik, ezzel a vertikális terjedésre hívják fel a figyelmet [60], [61].

Afrikában és Olaszországban 2-12 éves gyermekekben mutatták ki mind a LANA, mind az orf65/vp 19 elleni ellenanyagot, mely a horizontális terjedés lehetőségére utal. Afrikában

az ellenanyag ráta az életkorral nő a pubertáskor alatti gyerekeknél [62]. Ezek az adatok felvetik annak a lehetőségét - hasonlóan más herpesvírusokhoz -, a nyállal történő fertőzésnek fontos szerepe lehet a HHV-8 terjedésében a prepubertás előtti gyerekek között endémiás területeken, ahol a HHV-8 infekció már 1 éves kor alatt is bekövetkezhet. Zambiában lázas csecsemőknél (<1 év) 8%-ban mutattak ki HHV-8-at [63, 64]. Dél-Afrikában egy vizsgálat szerint HHV-8 szeropozitív anyák kb. egyharmada fertőzte meg gyermekét HHV-8-cal [58]. Ezzel ellentétben az USA-ban és a fejlett országokban a non-szexuális terjedési mód ritkán fordul elő, a HHV-8 infekció általában a pubertáskor után történik.[2].

Vérrel, vérkészítménnyel történt átvitelre is van lehetőség, hiszen a HHV-8-at lehet detektálni szeropozitív vradók perifériás mononukleáris vérsejtjeiben (PBMC) és szérumban, mégis ritka. A transzfúziós és a hemofiliás rizikócsoportha tartozó HIV-fertőzöttek között a HHV-8 szeroprevalencia megegyezik az egészséges kontroll csoport prevalenciájával. Japán hemofiliások esetében nem találtak HHV-8 pozitívítást [65]. Azonban hosszú időn át tartó intravénás drogozás növeli a HHV-8 fertőződés kockázatát. A gyakran iv. drogot használó nők HHV-8 prevalenciája 2-3-szor magasabb, mint a nem iv. drogos nőké [66].

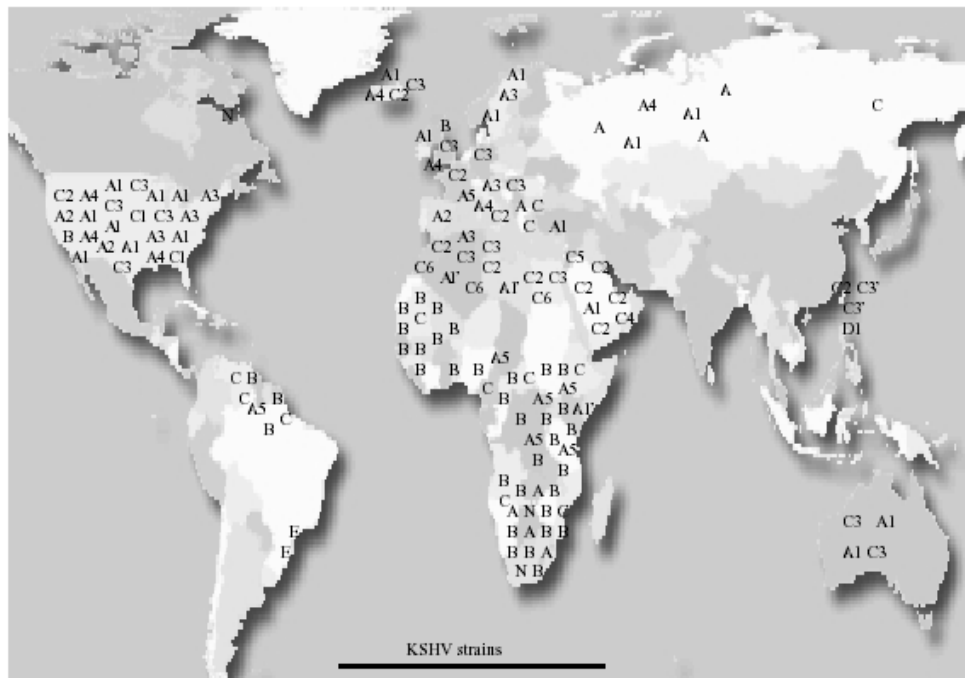
A transzplantációs betegek között a KS incidenciája 150-200-szor magasabb, mint a normál populációban, 0,4-0,6%-uknál fordul elő, leggyakrabban a vesetranszplantáltaknál, akiknek 0,2-5%-a KS beteg. Szív- és májtranszplantált betegeknél is előfordul KS, az erősebb immunszuppresszió miatt a mortalitás ezekben az esetekben magasabb. Itt is dominánsabban az előfordulás a mediterrán, illetve közel-keleti országokból betegeknél [67], [68].

Az eddig leírt poszt-transzplantációs KS esetek többsége (75%) a HHV-8 reaktivációjának következménye volt. Donorszervvel történő átvitelt 16 esetben írtak le, egy esetben állt rendelkezésre a donortól is minta, illetve 2 esetben molekuláris biológiai módszerekkel bizonyították a donorszervvel történő átvitelt [69], [70]. A KS kialakulását inkább az immunszuppresszív terápiával hozzák összefüggésbe (pl. vesetranszplantáltak cyclosporin terápiája), melynek következtében reaktiválódik a HHV-8.

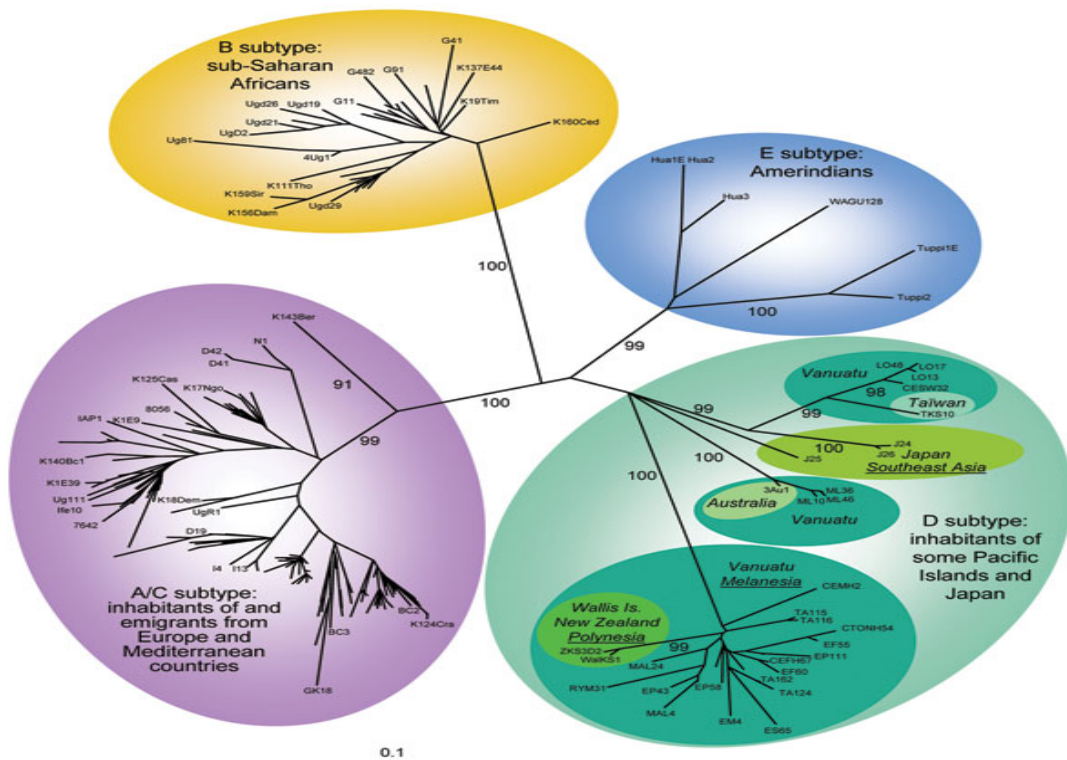
2.2.5. A HHV-8 törzsek és elterjedésük

Korábban a genotípusos osztályozás az orf26 (minor kapszid) és az orf 75 (tegument) régiók szekvencia analízisén alapult, melyek alapján orf 26 régiótól függően a HHV-8-nak három fő szubtípusát (A, B, C), valamint az orf 75 régió alapján 1 szubtípust (N) különböztettek meg. Azonban ezeknek a régióknak alacsony szintű a variabilitása (1,5-2%), ezért később a genom bal oldali 5' oldali végén található hipervariábilis orf-K1 gén alapján végezték a tipizálást (5. ábra). A 289 aminosavból álló K1 glikoprotein gén extracelluláris doménje két extrém variábilis régiót tartalmaz (VR1 és VR2), amelyek aminosav szekvenciája akár 60%-ban, nukleinsav szekvenciája akár 85%-ban is eltérő lehet. Az orf-K1 gén VR1 és VR2 hipervariábilis régióinak szignifikáns szekvencia és hossz variabilitása alapján a 7 fő szubtípust különböztetünk meg, A, B, C, D, E, F és Z.

A szubtípusokon belül eddig 24 különböző variánst írtak le (A1-A10, B1-3, C1-C6, D1-3, E1-2). A HHV-8 törzsek variánsainak megoszlása függ földrajzi és etnikai hovatartozástól is (8. ábra). Európában, az Egyesült Államokban, a Közel-Keleten és Ázsiában az A és C szubtípusok fordulnak elő gyakrabban. Közép-, és Kelet-Európából jelenleg kevés adat áll rendelkezésre a HHV-8 törzsek genetikai variabilitását tekintve. Csak Oroszországból és Görögországból jelentek meg adatok, melyek szerint a törzsek többsége az A és C szubtípusba sorolhatóak. Afrikában és Francia-Guyanában a B szubtípus dominál. A ritka D szubtípusról először a Csendes-óceán térségéből, valamint Tajvanból és Ausztráliából számoltak be. Az E szubtípusra a dél-amerikai (ecuadori, brazíliai) indián lakosság körében és az Amazonas térségében bukkantak, amely az összes többi szubtípustól kb 25-30%-ban különbözik. A nagyon ritka Z szubtípust zambiai gyerekek között identifikáltak, és a legújabb F szubtípus Ugandában terjedt el (9. ábra).



8. ábra. A HHV-8 szubtypusok földrajzi eloszlása [44].



9. ábra. Néhány törzs filogenetikai ábrázolása [71].

2.3. A humán herpesvírus onkogén hatása

2.3.1. A Kaposi sarcoma és kezelési lehetőségei

A *Kaposi sarcoma* (angiosarcoma idiopathicum haemorrhagicum Kaposi - KS) éreredetű, rosszindulatú kötőszöveti daganat. A kórkép első leírója Kaposi Mór magyar származású bécsi bőrgyógyász volt 1872-ben [72]. A betegséget idős férfiaknál észlelte, akiknek a kezén kicsi, 2-3 mm-es vörös, kékeslila vagy barnás fájdalmas csomók jelentkeztek. Ezen csomók jellemzője, hogy lassan növekednek, összefolynak és fájdalmas, nagyobb gyulladt területeket hoznak létre, melyek könnyen kisebesednek akár egy kisebb sérülés kapcsán is. A megbetegedés lassú lefolyású, 5-10 év alatt vezet halálhoz, de olyan eset is ismert, ahol még 25 évig élt a beteg a betegség felismerését követően [73].

A bőr mellett körülbelül 10 százalékban belső szervi tünetek is lehetnek, leggyakrabban az emésztőtraktus vagy a máj területén. Viszonylag gyakran a szájnyálkahártyán észlelhetőek az első tünetek, melyekre fogászati kezelés kapcsán derülhet fény. Belsőszervi érintettség esetén bizonytalan hasi panaszok hívhatják fel a figyelmet a daganatra. Néhány beteg esetében nyiroködéma jön létre amiatt, hogy a túlbujánzó daganatos sejtek összenyomják a nyirokereket [74].

A *Kaposi sarcoma*-nak négy klinikai formája ismert:

- (1) *Klasszikus* (Kaposi által leírt) KS: az általában indolens lefolyású, ám olykor progresszióra hajlamos klasszikus típus elsősorban hetven év feletti férfiak lábán kifejlődő bőrt érintő kórforma, mely lassan terjed tovább (a férfi: nő arány – 15:1). Dél-Olaszországban, Görögországban és Izraelben előfordulása gyakoribb [75]. Az átlagos túlélési idő 10-15 év.
- (2) *Epidémiás vagy AIDS-hez társuló* KS: az AIDS betegek közel 35-40%-ánál jelentkezik, a leggyorsabban és agresszívebben növő KS másfél-két év alatt a beteg halálához vezethet. A HIV-pozitívak között a homoszexuális férfiakon 20 százalékkal gyakoribb, mint az egyéb HIV-fertőzötteken. Ebben a típusban az esetek háromnegyed részében kimutatható belsőszervi érintettség. Jellemző, hogy az utóbbi években egyre kisebb arányban fejlődik ki az AIDS-betegeken KS, feltehetően a korszerű vírusellenes szerek alkalmazása miatt [76], [77].

- (3) *Endémiás afrikai KS*: Kelet- és Közép-Afrikában dominál, a leggyakoribb tumor, a klasszikus típushoz képest lényegesen kedvezőtlenebb prognózissal. Jellemzően a végtagok kifejezett duzzanatával jár és a gyorsan elhatalmasodó belszervi érintettség következtében korai halált okoz [44].
- (4) *Iatrogén vagy poszt-transzplantációs KS*: szervtranszplantáltak körében az átlag populáció értékeihez képest mintegy 500-1000x-es gyakorisággal alakulhat ki. Leggyakrabban veseátültetést követően fejlődik ki, amikor erős gyógyszerekkel tartósan legyengítik a szervezet védekezőrendszerét a szerv kilökődésének megakadályozása érdekében. Ilyenkor évekkel a szervátültetést követően fejlődik ki a daganat [78].

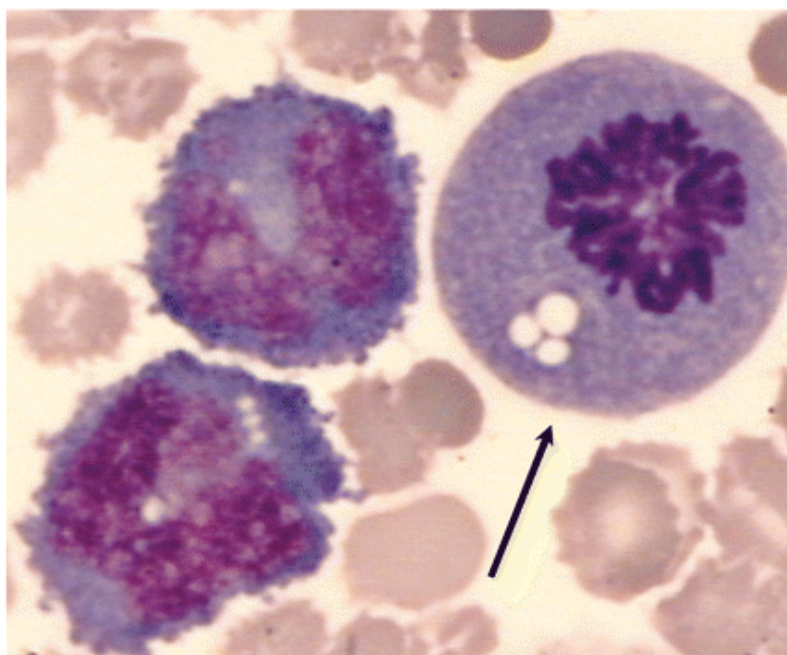
A KS Észak-Amerikában és Észak-Európában régebben szórványosan fordult elő, majd a HIV pandémia terjedésével világszerte gyakori tumorrá vált (sokan ezzel a betegséggel azonosítják az AIDS-t). Az epidemiológiai adatok szerint – a KS a HIV-pozitív betegek körében 20.000-szer gyakrabban fordul elő, mint a normál populációban, és a homo-, biszexuális férfiak körében 5-20-szer gyakoribb, mint az egyéb HIV rizikócsoportokban [79], [26].

Magyarországon alapvetően a *klasszikus Kaposi sarcoma* fordul elő, amely ritka. A debreceni Bőrgyógyászati Klinikán, mint regionális centrumban több év alatt gyűlt össze a kutatásaink során felhasznált betegek anyaga. Hazánkban előfordulnak még AIDS-hez és transzplantációhoz társuló esetek is. Ugyan mindkettő rizikó csoportban jelentősen emelkedik a KS kockázata, de összeségében mindkettő csoportnak alacsony a létszáma ahhoz, hogy nagyobb számú KS eseteket lehessen elemezni.

A terápiás lehetőségek a betegség típusának, stádiumának, progressziós tendenciájának, a tünetek megoszlásának és az immunstátusznak a függvényében módosulhatnak. A *klasszikus Kaposi-sarcoma* első két stádiumában a benignus klinikai viselkedésnek megfelelően legfeljebb helyi kezelés indokolt: sebészi excízió; kis dózisú, frakcionált sugárterápia; cryoterápia; intrafokálisan adott alkaloidok. Progresszió, előrehaladottabb stádium, viscerális érintettség esetén kerül előtérbe a szisztémás kezelési mód. A leginkább hatékonyak bizonyult kemoterápiás vegyületek a liposzómális anthracyclinek és a taxánok közé tartozó paclitaxel. Kedvező eredményt hozhat az immunmoduláns hatású interferon- α (IFN- α) kezelés.

2.3.2. A testüregi B-sejtes lymphoma (BCBL) és kezelési lehetőségei

A testüregi B-sejtes lymphoma (BCBL, *body-cavity-based lymphoma* vagy PEL, *primary effusion lymphoma*) - a nagy sejtes non-Hodgkin lymphoma egyik ritka, ám végzetes formája, elsősorban immundeficiens egyéneknél fejlődik ki. A túlélési idő kevesebb mint 6 hónap [80]. Jellemző a lymphomatous folyadék jelenléte, mely a pleurális, pericardiális és peritoneális testüregeket érinti. Általában HIV pozitív, néha szervátültetett betegekben, vagy nagyon ritkán idős korban jelentkező megbetegedés HHV-8 pozitivitás mellett. A c-myc protoonkogén génátrendeződése hiányzik – kóros c-myc transzkripció és kórosan magas c-myc mRNA szint a BCBL betegek jelentős részében megfigyelhető [81]. A HHV-8 bizonyítottan érintett a BCBL patogenezisében, a malignus átalakulásban és progresszióban. Az esetek többségében (kb. 70%-ban) a HHV-8 az EBV-vel együtt fordul elő (kettős fertőzöttség), de leírtak EBV negatív, HHV-8 pozitív eseteket is, továbbá a betegek 25%-ánál KS is kialakul [82]. Ez a kórforma HIV-negatív betegekben is előfordul [83], [45], [44].



10. ábra. BCBL malignus sejt a mellhártya üregből. A sejtek éretlenek hatalmas sejtmaggal, közepes mennyiségű bazofilikus cytoplasmával. A nyíl egy mitózisra mutat (Cytospin preparáció, May-Grünwald-Giemsa festés)
(Forrás: <http://www.pubcan.org/printicdotopo.php?id=5251>)

A testüregi B-sejtes lymphoma B-sejt eredetű daganat, azonban a tumorsejtek sem morfológiailag, sem immunfenotípusukat tekintve nem sok hasonlóságot mutatnak a normális B-sejtekkel (10. ábra). A leggyakoribb megjelenési formája átmenet az immunoblasztikus és anaplasztikus nagy sejtes lymphomák között és különböző mértékű plazma sejt differenciálódást mutat [84], [82], [85]. Az összes ismert esetben a monoklonális B- sejt-populáció fertőzött HHV-8-cal. A BCBL diagnózisa a testfolyadék citológiai vizsgálatán alapul. A CD45 antigén expressziója (az esetek több mint 90%-ában) megerősíti a testüregi B-sejtes lymphoma sejtek haematolymphoid eredetét, amelyek határozatlan immunfenotípusra mutatnak, ugyanis általában hiányoznak a B- és T-sejt-asszociált antigének expressziója. Vannak azonban olyan leírt esetek az irodalomban, hogy egy B- sejt vagy T -sejt fenotípusos megjelenést mutatott [85] [86].

A neoplasztikus sejtek HHV-8 fertőzőittségének bizonyítása elengedhetetlen a testüregi B-sejtes lymphoma felállításához [86].

Tekintettel arra, hogy ritka betegség, a legtöbb klinikai és patológiai adat esettanulmányból ismert. Épp ezért a HHV-8-ra vonatkozó releváns biológiai információ a BCBL-ből származó sejtvonalak tanulmányozásából származik, melyek számos virális gént (látens és lítikus) fejeznek ki, valamint segítségükkel kutatni lehet a proliferációt, angiogenezist és a gyulladásos folyamatokat [87], [88].

A jelentős javulást az AIDS-hez kapcsolódó lymphomák prognózisában az antiretrovirális terápia korszak megjelenését követően lehetett megfigyelni. Majd a növekedési faktorok (például a granulocita kolónia-stimuláló faktor, G-CSF) rutinszerű használata hozott jelentős javulást, mellyel elkerülhető a hosszú ideig tartó kemoterápiás kezeléssel adódó neutropénia kialakulása, mely a standard protokoll része a HIV+ BCBL betegek kezelésénél. Annak ellenére, hogy az utóbbi években javultak a terápiás stratégiák, nincs szisztémás kemoterápiás protokoll ezen betegség kezelésére. A leggyakrabban használt sémák a B-sejtes lymphomák sémáját követik, mely a betegség stádiumától függően különböző polikemoterápiát javasol. Elsődleges kezelésként javasolt kombinációként a CHOP (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin és prednisolon) kezelést alkalmazzák nagy dózissal methotrexattal társítva. Előrehaladott stádiumú, rossz prognózisú esetekben szóba jöhet a BEACOPP alap dózissal protokoll (bleomycin, etoposid, doxorubicin, cyclophosphamid, vincristin, procarbazin, prednisolon). Legújabb az antivirális terápia is

előtérbe kerül. BCBL betegekben HIV-fertőzéstől függetlenül, hosszan tartó teljes remissziót tapasztaltak cidofovir beadását követően, mely vírusellenes szer. A testüregbe jutott cidofovir, valamint interferon- α , egy eredményes választás lehet a betegeknek a hagyományos kemoterápiával szemben vagy idős betegek esetén, akik nem jogosultak több toxikus szisztémás terápiára. Egy másik lehetőség a proteaszóma gátló gyógyszerek alkalmazása, mint például a bortezomib, mely apoptózist indukál BCBL sejtvonalakban in vitro.

2.4. A daganatellenes kemoterápia fejlődése

2.4.1. Kezdetek

Az első korszerű kemoterápiás antibakteriális ágens a Paul Ehrlich által a szifilisz gyógyítására 1909-ben kifejlesztett Salvarsan (arzfenamin) volt. Ezt olyan széles körben elterjedt természetes és szintetikus vegyületek követték, mint az Alexander Fleming nevéhez fűződő penicillin (1928) vagy a Gerhard Domagk által kikísérletezett szulfonamidok (1932).

Daganatos megbetegedések gyógyítására először a 20. század elején használtak kemoterápiás szereket. Az első világháború során harci gázként használt mustárgázzal és származékairól kiderült, hogy alkiláló ágensként megfelelő dózisban adva a gyorsan osztódó csontvelői leukémiás sejteket képesek elpusztítani úgy, hogy az egészségeseket kevésbé károsítják. Az Egyesült Államok Védelmi Minisztériuma Louis Goodman és Alfred Gilman gyógyszerészeket kérte fel, hogy vizsgálják a vegyi fegyverek terápiás alkalmazásának lehetőségét a humán gyógyításban. 1942-ben lymphomas betegeknek intravénásan adtak mustárnitrogén típusú vegyületeket, mivel korábban a mustárgáz hatásának kitett emberek szövettani mintáiban kifejezett lymphoid és myeloid szuppressziót figyeltek meg. Feltételezésüket először állatkísérletekkel erősítették meg, majd egy non-Hodgkin lymphomában szenvedő betegnél figyeltek meg drámai tumortömeg csökkenést [89], [90], [91].

A mustárnitrogének után a következő nagy előrelépés az első antimetabolit, a methotrexat daganat ellenes hatásának felismerése volt. Sidney Farber, a Harvard Egyetem patológusa a folsav hatását vizsgálta leukémiás betegségekben. Akut limfoblasztos leukémiában (ALL) szenvedő gyerekeknek folsavat adva a betegség súlyosbodását tapasztalták, ugyanis

az serkenti a leukémiás blasztok szaporodását. Farber a folsavhoz hasonló szerkezetű aminopterint (később amethopteint, ami a ma ismert methotrexatnak felel meg) adott ALL-es betegeknek. A folsav antagonistája methotrexat meggátolta a folsavat igénylő enzimek működését, és hatására jelentős javulás következett be, bár az elért hatás csak átmeneti volt. Az ugyanakkor világossá vált, hogy a folsavat semlegesíteni képes vegyületek alkalmasak lehetnek a tumorok kezelésére [92]. Ez képviselte az első gyógyszercsoportot, amelyet nem véletlenül fedeztek fel, hanem már tudatosan állították elő. Később a methotrexatot szolid daganatok kezelésében is hatékonynak találták, ezek közül a legátütőbb eredményt a choriocarcinoma kezelésében érték el, melyet a methotrexat kezelés önmagában is képes volt meggyógyítani [93], [94].

2.4.2. Citosztatikumok (citotoxikus szerek)

A daganatgyógyítás legősibb módszeréhez, a sebészeti ellátáshoz a XX. század második évtizedében csatlakozott a sugárterápia [95]. E két módszer a tumor lokális elpusztítását célozza. Sajnos a klinikai tünetek megjelenésekor az esetek többségében már mikrometasztatikus folyamatok is jelen vannak, így a helyi ellátást ki kell egészíteni az egész szervezetre ható gyógyszeres kezeléssel. Habár az utóbbi években újabb és újabb célzott biológiai szerek kerülnek forgalomba, az előrehaladott daganatos betegségben szenvedő betegek döntő többsége még ma is kemoterápiában részesül. A terápiás sikerek ellenére, napjainkban a vezető halálokok között az érrendszeri megbetegedések után a második helyen a daganatos betegségek foglalnak helyet. Ennek egyik oka az, hogy az előrehaladott és metasztatizált daganatok kemoterápiás kezelése még ma sem megoldott. Ezekben az esetekben a malignus betegségek molekuláris biológiájának ismerete, az adott egyén adott tumorának, egyénre szabott, célsejt specifikus terápiája, a génterápia, a daganat elterjedésében szerepet játszó enzimek, angiogenetikus faktorok gátlása, valamint különböző daganatellenes vakcinák alkalmazása jelenthetnek eredményes megoldást.

A következő években kisméretű, gátló molekulák (small molecule) megjelenése és az adoptív immunterápia fejlődése hozhat megoldást a kemoterápiára nem reagáló daganatok terápiájában.

Általánosságban citosztatikumnak nevezünk minden olyan anyagot, amely valamilyen módon gátolja a tumoros folyamatokat és optimális esetben pedig teljes felépüléshez vezet. A probléma az, hogy minden szervezet egyedileg reagál a rosszindulatú daganatokra. További nehézség, hogy még mindig nem ismerjük pontosan azokat a biokémiai folyamatokat, melyek gátlásával (vagy éppen felerősítésével) meg lehetne állítani a kóros sejtburjánzást, valamint a citosztatikumokkal szemben is kialakulhat rezisztencia. Ez lehet primer vagy szekunder aszerint, hogy a sejtek eleve érzéketlenek a hatóanyagra, vagy csak a kezelés kapcsán váltak ellenállókká. A szekunder rezisztencia kifejlődésének megakadályozására több, különböző hatásmechanizmusú és támadáspontú citosztatikumot alkalmaznak egyidejűleg kombinációs terápiában. A főbb citosztatikumok láthatóak a hatásmódjuk alapján csoportosítva a 2. táblázatban.

2. táblázat. Néhány citosztatikum és azok csoportosítása (Forrás: http://www.whocc.no/atc_ddd_index/)

		Hatóanyag	Hatás
Alkylező szerek	Mustárnitrogén-analógok	Cyclophosphamid Chlorambucil Melphalan Ifosphamid Bendamustin	Keresztkötések létrehozása a DNS szálak között
Antimetabolitok	Folsav analógok	Methotrexat Pemetrexed	Purin és pirimidin
	Purine analógok	Mercaptopurin Tioguanin Cladribin Fludarabin Clofarabin	bázisok szintézisét gátolják, illetve a nucleinsavba beépülve hibás szekvenciákat okoznak
	Pyrimidine analógok	Cytarabin Fluorouracil Gemcitabin	
Növényi alkaloidok és egyéb természetes készítmények	Vinca alkaloidok és analógjai	Vinblastin Vincristin Vinorelbin	Mitotikus apparátus gátlók
	Podophyllotoxin-származékok	Etoposid	
	Taxanok	Paclitaxel Docetaxel	Mikrotubulusok lebomlásának gátlása
Cytotoxicus antibioticumok és rokon vegyületek	Actinomycinek	Dactinomycin	DNS
	Anthracyclinek és rokon vegyületek	Doxorubicin Daunorubicin Epirubicin Idarubicin	szintézisének gátlása, keresztkötések létrehozása
	Egyéb cytotoxicus antibioticumok	Bleomycin Mitomycin Hydroxyurea	DNS láncok között, DNS alkilálás
Egyéb cytostaticumok	Platina-vegyületek	Cisplatin Carboplatin Oxaliplatin	DNS vagy előanyagainak szintézisét gátlók, DNS károsítók
	Egyéb	Asparaginase Bortezomib	Fehérje szintézis gátlók

2.4.3. A citosztatikumok hatásmechanizmusa és mellékhatásai

A citosztatikumok nagyrésze nem specifikus az adott daganat-típusra. Ezt a klinikai gyakorlat is alátámasztja, hiszen ugyanazt a citosztatikumot egymástól teljesen eltérő szövettani eredetű és viselkedésű daganatokban használjuk. Jó példa erre az anthracyclinek csoportja, amelyeket a legkülönbözőbb tumoros betegségekben alkalmazunk: így pl. a doxorubicin egyaránt része a leukémiák [96], a Hodgkin [97] és non-Hodgkin lymphoma [98], emlő carcinoma [99], gyermekkori kis kereksejtes tumorok [100], [101], csont- és lágyrész-sarcomák kezelési protokolljainak [102]. A citosztatikumok hatásukat döntően az osztódó sejteken fejtik ki. Nagy részük a DNS károsítása révén állítja le a sejtosztódást, és a sejtek apoptózisát indukálja [103]. A hatásban szerepet játszik a daganatsejtek károsodott DNS repair mechanizmusa is [104]. A DNS-t károsíthatja a citosztatikumnak a DNS kettős lánc közé interkalálódása, a keletkező szabadgyökök károsító hatása (anthracyclinek [103]), a topoizomeráz I vagy II működésének gátlása (anthracyclinek [103], camptotechinek [105]), a gyógyszer okozta törések, DNS szálon belül, vagy azok között létrehozott keresztkötések (platinaszármazékok [106], alkyláló ágensek [107]). A citosztatikumok másik csoportja a DNS szintézist gátolja (purin- [108], pirimidin analógok [109]). Több szer hatásmechanizmusa csak részben ismert: bleomycin: DNS ligáz gátlás, DNS károsítás [110] [111], hydroxyurea: feltételezett ribonukleotid reduktáz inhibitor [112], dactinomycin : feltételezett RNS szintézis gátlás, DNS-hez kötődés [113], [114], [115]). A vinca alkaloidok a mikrotubulus polimerizációját gátolják [116], a taxánok viszont stabilizálják a felépült mikrotubulusokat [117]. A gyógyszerek beavatkozhatnak a daganatsejtek metabolizmusába (methotrexat: dihidrifolat reduktáz inhibitor [118]; asparaginase: a daganatsejtek aszparaginsav-szintézis defektusa esetén hat [119]). A bortezomib reverzibilisen gátolja a 26S proteaszóma kimotripszin-szerő aktivitását [120]. Hatásmechanizmusuktól függően a kemoterápiás szerek egy része a sejtciklus bizonyos fázisában hat: metafázis: vinca alkaloidok [121], etoposid [122], taxánok [123]; S fázis: hydroxyurea [112] 5-fluorouracil [124], cytarabin [125]; G1-S fázis átmenet: cytarabin [126], G2 fázis: bleomycin [110], míg mások nem sejtciklus-specifikusak pl. daunorubicin [125]. A citosztatikumok hatása abban az értelemben sem specifikus, hogy nemcsak a daganatsejteket, hanem az egészséges sejteket is károsítják. Éppen a szelektivitás hiánya jelenti a kemoterápiás szerek használatának legnagyobb akadályát, hiszen ezek okozzák a szerek komoly mellékhatásait. Így az utóbbi évek kutatásai a minél szelektívebb

hatóanyagok kifejlesztése, az egészséges sejtek védelme és a mellékhatásokat kivédő gyógyszerek fejlesztése felé irányult.

Az alkalmazható dózis nagyságát a jelentkező mellékhatások korlátozzák. A fenti gyógyszerek többsége csontvelő szuppressziót okoz. A kezelést követően a betegek csontvelő funkciójának visszatérése alatt, a szupportív terápia részeként elengedhetetlen a vörösvérsejt szuszpenzió és thrombocytákoncentráció adása, fertőzések esetén széles spektrumú antibiotikumok, antimikotikumok alkalmazása. Az anthracyclinek kardiotoxicitása [103], a platinaszármazékok vesetoxicitása ismert [127]. Az alkyláló ágensek közül a cyclophosphamid, ifosfamid súlyos haemorrhagiás cystitist, proteinuriát okozhat [128]. A rövidtávú mellékhatások mellett későiek is megjelenhetnek: a vinca alkaloidok késői neurotoxicitásáról, a platinaszármazékok, anthracyclinek, alkyláló ágensek nephrotoxicitásáról számoltak be [129] [130]. A gyógyszerotoxicitások mértékét és az individuális különbségeket az egyén gyógyszermetabolizáló képessége és farmakogenetikai különbségek is befolyásolhatják. A kemoterápia akkor hatékony, ha az előírt dózisban adjuk. Skipper és munkatársai állatkísérletei azt mutatták, hogy a dózis mindössze 20 százalékos csökkentése a gyógyulási arányt 50 százalékkal csökkentette, éppen ezért a kemoszenzitív tumoroknál mindenképpen törekedni kell a protokoll által előírt dózis beadására. Hatástalan kemoterápia adását viszont kerülni kell, hiszen ilyenkor a betegeket súlyos mellékhatásoknak tesszük ki anélkül, hogy a túlélésükön javítanánk.

2.4.4. A jövő útja: in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálatok

Ha két betegnél ugyanazt a daganatos megbetegedést diagnosztizálják, akkor is előfordulhat, hogy különbözőképpen reagálnak ugyanarra a terápiára. Az egyik betegnél hatékony a kezelés, míg a másik páciens kellemetlen mellékhatásokat tapasztal a terápiás célok elérése nélkül. Ezek a különbségek a betegek genetikai és egyéb biológiai eltéréseiből fakadnak, valamint a tumorok rendkívül változatos, időben és térben változó genetikai módosulásából származnak. Minden tumor személyenként különböző, ahogy minden ember más. A személyre szabott orvoslás megközelítés lényege, hogy betekintést nyerjünk ezekbe az eltérésekbe molekuláris szinten olyan tesztek és gyógyszerek kifejlesztése révén, amelyek speciális betegcsoportok szükségleteit elégítik ki. A személyre szabott gyógyszerek olyanok, melyekről diagnosztikus eszközökkel meg tudjuk mondani,

mely páciensek számára előnyös, mely betegek számára semleges vagy egyenesen hátrányos.

Az eddiginél differenciáltabb terápia több módon is megvalósítható. Az egyik lehetőség egy részletes molekuláris tumor térkép létrehozása, mely a tumor viselkedésének alapos megértéséhez vezet. Több tumoros megbetegedés pontos molekuláris mechanizmusát leírták, mely segítségével célzott kezelés alkalmazása vált lehetővé.

Az egyénre szabott terápia kidolgozásának másik lehetősége, hogy a daganatsejtek gyógyszerérzékenységét direkt módon vizsgáljuk. Több próbálkozás történt erre alkalmas in vitro módszer kialakítására. Minden esetben az volt a cél, hogy olyan in vitro vizsgálati körülményeket alakítsanak ki, ahol a kapott eredmény jól korrelál az in vivo hatással.

Néhány ilyen technikát széles körben használnak, például az MTT (metil-thiazol-tetrazolium) tesztet [131], mely széleskörben elterjedt és egyszerűen kivitelezhető eljárások közé tartozik. A tumorsejtek négy napos inkubációját követően MTT festéket adnak a sejtekhez, amit az élő sejtek mitokondriális enzimekkel kék színű formazánná alakítanak. A kapott színintenzitás korrelál az élősejtek számával. A módszer előnye, hogy könnyen kivitelezhető, eszközigénye nem nagy és a kevésbé költséges eljárások közé tartozik. Hátránya, hogy nagyszámú sejtet igényel, illetve egy betegmintából csak néhány gyógyszer hatása vizsgálható. Vagy például az ATP (adenosine triphosphate bioluminescence) teszt is elterjedt [132], mely alkalmazásakor a tumorsejteket a gyógyszerekkel történt inkubációt követően lizálják. A lizátumban az élősejtekből felszabaduló ATP mennyiségét mérik (ami korrelál a túlélő sejtek számával) luciferin hozzáadását követően. Azokon a sejtmintákon működnek hatásosan a gyógyszerek, ahol alacsony a lumineszcencia, tehát alacsony az ATP szint.

Az in vitro tesztek széleskörű elterjedését és ezen eredmények klinikai felhasználását több tényező korlátozza:

1. A módszerek többsége költséges, a sikeres vizsgálatához nagyszámú tumorsejt szükséges, ami a vizsgálható gyógyszerek számát korlátozza.
2. A daganatok nagy részében már vannak bizonyítottan hatásos protokollok, így a még nem kezelt betegek esetében a klinikai szakorvosok elsősorban a nagy betegszámon hatásosnak bizonyult kezelési formákat alkalmazzák.

Manapság elsősorban a recidiváló daganat kezelésében lehet hasznos az in vitro gyógyszerérzékenységi teszt alkalmazása. A tumor recidívájakor ugyanis a klinikus már egy sokkal agresszívabb kezelést igénylő betegséggel áll szemben. A primer daganat/betegség kezelésére előírt protokollok ezekben az esetekben már rendszerint hatástalanok. Vannak ugyan recidíva esetén alkalmazható protokollok, ezekkel azonban általában a gyógyulási esély igen csekély. Ilyen esetekben az in vitro gyógyszerérzékenység meghatározása, s az eredmény alapján megválasztott individualizált terápia alkalmazása kifejezetten javíthatja a túlélést.

A személyre szabott terápia óriási lehetőségeket rejt magában, hogy az egészségügyet jobbra, biztonságosabbá és költséghatékonyabbá tegyük. Határozott és növekvő igény mutatkozik a magasan differenciált gyógyszerekre, melyek pozitív hatással vannak a népegészségügyre. Még bizonyára eltart egy ideig, mire a személyre szabott orvoslásban rejlő potenciált össztársadalmi szinten is felismerik, de a piaci trendek mindenképp elmozdulnak abból az irányból, melyet a sztenderdizált gyógyszerek jelentenek.

2.5. Filogenetikai összefüggések kimutatása egyes vírus szubtípusok elterjedésének vizsgálatára

A vírustörzsek közötti különbségek - a nukleotid és aminosav szubsztitúciók - segítségével vizsgálhatóak a törzsek filogenetikai kapcsolata. A filogenetikai csoportosításában általánosan elfogadott kifejezések: típus, genotípus, szubtípus, csoport és alcsoport. Az egyes vírusfajoknál természetesen más és más értékek jelentik a genotípusok, és az azon belüli csoportok határait, általános azonban, hogy az értékeket befolyásolják a kórokozó biológiai tulajdonságai, és földrajzi elterjedtsége, ezek pedig az adott vírus járványtanát is jól jellemzik. Vagyis a rokonsági viszonyok meghatározásán túl, a szekvencia adatokon alapuló filogenetikai vizsgálatok a betegségek epidemiológiai hátterének felderítéséhez is szolgáltatnak információkat. A filogenetikai analízis során kapott törzsfák egyrészt tájékoztatnak a populáción belüli genetikai diverzitás mértékéről, másrészt olyan fontos adatok nyerhetők a segítségével, minthogy egy adott járvány egy, vagy több genetikai vonalnak tulajdonítható-e.

Minden filogenetikai módszer tükrözi a korának megfelelő tudásszintet és technikai színvonalát, a jelenleg használatos eljárások hátterében olyan algoritmusok állnak, melyek

a DNS, RNS és fehérje szekvenciák evolúciójának lehetséges modelljeit próbálják meg reprezentálni. A filogenetikai analízis módszerei lehetnek távolság-mátrix (kvantitatív) és karakter (kvalitatív) alapú megközelítések. Mindkettő eredményeként filogenetikai fát kapunk, amely nem más, mint a vizsgált taxonómiai egységek, esetünkben vírustörzsek közötti rokonsági viszonyok grafikai ábrázolása. A távolság-mátrix alapú megközelítéseknel (pl. UPGMA, Fitch-Margoliash módszer, Wagner-féle távolság módszer) a kiindulási alap egy távolság- mátrix, ami tartalmazza a vizsgált adatok (esetünkben nukleinsav szekvenciák) becsült, páronkénti összehasonlításából származó távolság értékeit. Távolság mátrixok képzésének egyik legegyszerűbb módja a súlyozatlan párok kialakítása mértani átlagok alkalmazásával (UPGMA), ahol a legkisebb távolságot mutató taxonpár kiválasztásával, azokat egyben közös őssel rendelkező, legközelebbi rokonoknak is tekintjük. A többi taxon távolsága ehhez viszonyítva határozható meg. A módszer alapvető hibája, hogy a különböző taxonok közötti eltérő szubsztitúciós rátából származó hatást nem veszi figyelembe. Széles körben elterjedt távolság-mátrix alapú alkalmazás az ún. neighbor-joining módszer [133], mely lényegében egy ún. cluster-analízis, és kiküszöböli a fentebb említett problémát. A módszer a minimális evolúció hipotézise alapján a leghasonlóbb két szekvenciát kiválasztva, pontértékük számtani közepével jellemzett hipotetikus taxont hoz létre. A következő lépésben ismét összeveti az összes taxont (szekvenciát), beleértve az előző lépésben a két legközelebbi taxonból újonnan létrehozott hipotetikus taxont is, és a két legközelebbit megint összevonja, ezáltal a taxonok száma minden lépésben eggyel csökken. Az átalakított távolság-mátrix használata azonban a fa torzulását eredményezheti, mert nem veszi figyelembe, hogy a nt szubsztitúcióknak többféle típusa is létezhet (egyszeres, többszörös, koincidentális, paralel, konvergens, back). Emiatt bizonyos korrekciókra van szükség ahhoz, hogy kiküszöböljük az evolúciós távolság alulértékelését [134].

A fák megbízhatóságát „bootstrap” analízissel [135], [136] vizsgáltuk, mely véletlenszerű mintavételezéssel generál – esetünkben 100 – egymástól független fát, majd ezekből egy konszenzus fát készít, és minden ágra megadja, hogy ez a generált fák mekkora hányadában szerepelt. Általában a 90% feletti „bootstrap” érték mellett nevezhető a kapott fa elágazásrendszere, és az azt létrehozó filogenetikai módszer megbízhatónak, az 50% alatti „bootstrap” értékek már nem mindig tükrözik megfelelően

a filogenetikai kapcsolatokat, ezért érdemes egyéb módszerrel is elemezni a rendelkezésre álló adatokat, a valós filogenetikai viszonyok megállapításához [137].

A filogenetikai vizsgálatok másik módja az egyedi karakterek összehasonlításán alapuló módszer (parsimony). Az eljárás a szekvenciák nukleotid-, vagy aminosav pozícióit, mint karaktereket direkt módon hasonlítja össze. A módszer lényege a takarékoság, eszerint az a fa tükrözi leginkább a valós leszármazást, amelyik a legkisebb számú evolúciós változást igényli a taxonómiai egységek közötti különbségek magyarázatára. A kapott törzsfa ágai arányosak az evolúciós változások számával, a távolság alapú módszerekkel nyert filogenetikai fákhöz képest a „parsimony” fák többletinformációt is hordoznak, mégpedig azt, hogy pontosan melyik pozíció járult hozzá egy adott ág hosszúságához. A módszer hátránya, hogy a konvergens evolúció modellezésére kevésbé alkalmas.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaim során az alábbi két témakörbe tartozó kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

1. Kollaboráció keretében a stockholmi Karolinska Intézetben kaptam lehetőséget Dr. Székely László és Skribek Henriette munkacsoportjában, ahol egy speciális fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi módszer segítségével lehetőség kínálkozott daganatellenes terápiás kérdések tanulmányozására. Céljaim:
 - a. A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak in vitro gyógyszerérzékenységének vizsgálata.
 - b. A tesztelt 27 citosztatikum között HHV-8 indukált BCBL betegségek kezelésére eddig még nem használt, in vitro hatásosnak bizonyuló gyógyszerek keresése.

2. Munkámat a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikán kezelt *Kaposi sarcomas* betegektől gyűjtött paraffinos metszetekből nyert DNS mintákon elvégzett molekuláris biológiai vizsgálatokra alapoztam. Vizsgálataimban az alábbi kérdésekre kívántam választ kapni:
 - a. A hazai *Kaposi sarcomas* betegekben előforduló HHV-8 genotípusok meghatározása.
 - b. A HHV-8 K1 génjének részleges szekvenciáiból adatbázis létrehozása, majd ennek felhasználásával a törzsek filogenetikai vizsgálata.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált mintákat, sejtvonalatokat és módszereket a 2 fő témakörnek megfelelően ismertetem.

4.1. BCBL sejtvonalak gyógyszerérzékenységének vizsgálata

4.1.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények

Az első tanulmányban 11 testüregi B-sejtes lymphoma eredetű sejtvonalat használtunk, amelyeket kooperáció keretében szereztünk be: CRO-AP/2, CRO-AP/5, CRO-AP/6, BC-2, BC-3, CRO-AP/3, HBL-6, BC-3, BCBL-1, JSC-1, és BCP-1 (3. táblázat). A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak kialakítása még a kezelés megindítása előtt történt. A sejtek tenyésztéséhez 10% borjúsavóval (FCS, Sigma), 100 IU/ml penicillinnel (Sigma), 100 µg/ml streptomycinnel (Sigma), 80 µg/ml gentamycinnel és 2mM L-glutaminnal (Sigma) kiegészített IMDM (Iscove és Modified Dulbecco's Medium, Sigma) tápfolyadékot használtunk. A sejtuszpenziókat párásított inkubátorban 37°C-on 5% széndioxidot tartalmazó légkörben tartottuk. A sejteket hetente két alkalommal passzáltuk, hogy a tenyésztés alatt a sejtkoncentráció kb. 0.5×10^6 sejt/ml legyen. A mycoplasma fertőzés kizárására a kultúrákat Hoechst 33258 festéssel rendszeresen ellenőriztük.

3. táblázat. A gyógyszerérzékenységi teszt során használt sejtvonalak jellemzői

Sejtvonal neve	Beteg életkora/neme ^a	Diagnózis ^b	A beteg vírus státusza			Kórtörténet ^c	Eredet	Ref
			HHV-8	EBV	HIV			
BC-1	46 F	AIDS-PEL	+	+	+	elhunyt (12 nap)	Ascites folyadék	[138]
BC-2	31 F	AIDS-PEL	+	+	+	elhunyt (9 hó)	Pleurális folyadék	[138]
BC-3	85 F	Non-AIDS-PEL	+	-	-	NI	Pleurális folyadék	[139]
BCBL-1	40 F	KS AIDS-PEL	+	-	+	elhunyt (12 nap)	Ascites folyadék	[140]
BCP-1	94 F	KS non-AIDS-PEL	+	-	-	elhunyt (6 év)	Perifériás vér	[141]
CRO-AP/2	49 F	KS AIDS-PEL	+	+	+	elhunyt (7 nap)	Pleurális folyadék	[142]
CRO-AP/3	42 F	AIDS-PEL	+	-	+	Él (11 hó)	Ascites folyadék	[142]
CRO-AP/5	35 F	KS AIDS-PEL	+	+	+	elhunyt (6 hó)	Pleurális folyadék	[142]
CRO-AP/6	26 F	AIDS-PEL	+	-	+	NA	Pleurális folyadék	[143]
HBL-6 ^d	46 F	AIDS-PEL	+	+	+	NA	Ascites folyadék	[144]
JSC-1	52 F	AIDS-PEL	+	+	+	NA	Ascites folyadék	[145]

Magyarázat: **F:** férfi

a: a beteg életkora a sejtvonal létrehozásakor

b: az eredeti irodalomban megadott diagnózis – a betegnek kórtörténetében szerepel a Kaposi sarcoma a lymphoma diagnózis felállításakor

c: a beteg meghalt a jelzett időpontban a diagnózis felállításához viszonyítva, de a CRO-AP/3 élt 11 hónappal később is

d: BC-1-ből származó sejtvonal

NA: nincs adat

4.1.2. Gyógyszerek

Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálat elvégzéséhez 27 klinikumban is használt gyógyszert használtunk (4. táblázat). A gyógyszereket 50% dimethyl-sulfoxidban (DMSO, Sigma) oldottuk fel és 50 nl pöttyökben tettük fel a 384 lyukú lemezre HDRT (high density replicator tool, Beckman) rozsdamentes acéltűk segítségével Biomek 2000 robot (Beckman) használatával. Ugyanezt a robotot használtuk a gyógyszerenként négy hígítást tartalmazó törzslamezek (masterplate) elkészítéséhez egy- és nyolccsatornás pipettafejek alkalmazásával. A lemezen a legmagasabb gyógyszerkoncentrációkat a fizikai és kémiai szempontból maximálisan elérhető gyógyszerkoncentrációk 600-szoros hígításai adták meg (30 µl sejtszuszpenzió + 50 nl gyógyszer). Az így készült gyógyszer lemezeket több vizsgálatban is teszteltük, sejtvonalakon, valamint primer tumor mintákon egyaránt. Ezekben a vizsgálatokban igazolódott, hogy a gyógyszerek a lemezeken aktívak, ugyanis minden egyes gyógyszerre találtunk érzékeny sejtvonalat.

Az *in vitro* és *in vivo* gyógyszerkoncentráció közötti kapcsolat kiszámolásához az egyes gyógyszerek klinikumban használt dózisából, valamint a gyógyszerek felezési idejéből kalkulált 72 óra alatt *in vivo* AUC értékét (area under curve; a felszívódott és a szisztémás keringésbe jutott hatóanyag mennyiség), valamint az *in vitro* alkalmazott koncentrációból kalkulált értékeket használtuk, mely a QUAC ($QAUC^{72hr}$, Quotient of Area Under Curve) és a következő formulával számoltunk ki:

$$QAUC^{72óra} = in\ vitro\ AUC^{72óra} / in\ vivo\ AUC^{72óra} (\mu g x h / ml)$$

$$In\ vitro\ AUC = In\ vitro\ alkalmazott\ koncentráció \times 72\ óra (\mu g x hr / ml)$$

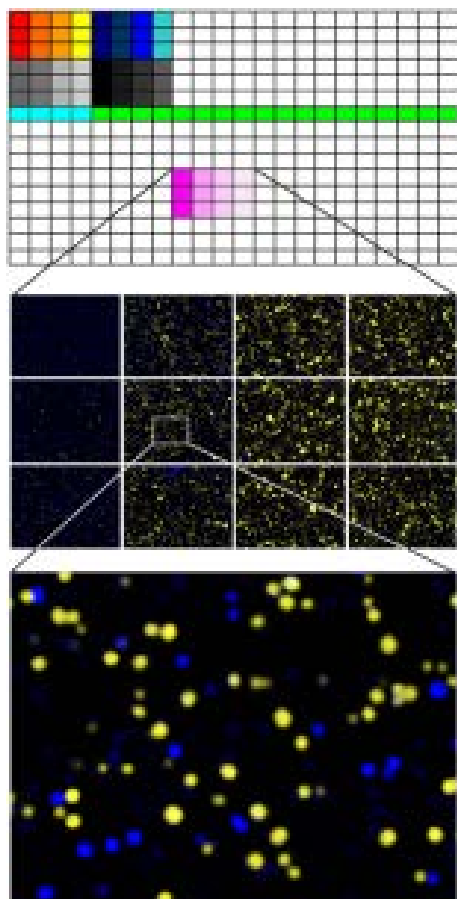
Az *in vivo* $AUC^{72óra}$: kalkulált érték, mely 72 óra alatti gyógyszerhatás a klinikai dózis és a félidőből lett számolva a trapezoid szabály szerint.

4. táblázat. A BCBL sejtvonalak gyógyszerérzékenységének meghatározásához használt gyógyszerek

	Clinical dose	Half time	<i>In vivo</i> AUC ^{72hr}	<i>In vitro</i> used concentrations	<i>In vitro</i> AUC ^{72hr}	Ref	QAUC
Methotrexate	12 g/m ²	24	623,70	0,033 - 4,17	12,000-1499,976	[146]	0,019 - 2,405
Cladribine	5 mg/m ²	3	5,67	0,007 - 0,83	0,480-59,976	[147]	0,085 -10,578
Fludarabine	25 mg/m ²	2	27,72	0,167 - 20,83	12,000-1499,976	[148]	0,433 -54,112
6-Mercaptopurin	85 mg/m ²	4	138,60	0,556 - 69,44	39,997-4999,680	[149]	0,289 -36,073
Cytarabine	1 g/m ²	2	221,76	0,133 - 16,66	9,596-1199,520	[150]	0,043 -5,409
Fluorouracil	400 mg/m ²	0.25	69,30	0,333 - 41,66	23,996-2999,520	[151]	0,346 -43,283
Gemcitabine	1000 mg/m ²	0.7	388,08	0,267 - 33,33	19,198-2399,760	[152]	0,049 -6,184
Chlorambucil	0.2 mg/m ²	2	33,60	0,667 - 83,33	47,998-5999,760	[153]	1,429 -178,564
Carboplatin	360 mg/m ²	3	665,28	0,007 - 0,83	0,480-59,976	[154]	0,001 -0,090
Oxaliplatin	130 mg/m ²	5.74	270,46	0,033 - 4,17	2,400-299,952	[155]	0,009 -1,109
Docetaxel	85 mg/m ²	0.6	24,95	0,067 - 8,33	4,798-599,760	[156]	0,192 -24,040
Paclitaxel	175 mg/m ²	3	257,80	0,013 - 1,67	0,956-119,520	[152]	0,004 -0,464
Vinblastin	1.7 mg/m ²	0.83	1,71	0,00067 - 0,083	0,048-5,998	[157]	0,028 -3,510
Vincristine	1.32 mg/m ²	2	1,55	0,00067 - 0,083	0,480-59,976	[158]	0,309 -38,636
Vinorelbine	80 mg/m ²	40	498,96	0,007 - 0,83	4,798-599,760	[159]	0,010 -1,202
Daunorubicin	1.5 mg/kg	18	531,56	0,033 - 4,17	2,400-299,952	[160]	0,005 -0,564
Doxorubicin	50 mg/m ²	30	1091,48	0,013 - 1,66	0,956-119,520	[161]	0,001 -0,110
Epirubicin	90 mg/m ²	15	604,21	0,013 - 1,66	0,960-119,952	[152]	0,002 -0,199
Dactinomycin	1.5 mg/m ²	36	8,98	0,003 - 0,42	0,240-29,995	[162]	0,027 -3,340
Bleomycin	8 IU/kg/day	6	33,26	0,008 - 1	0,576-72,000	[163]	0,017 -2,165
Mitomycin	20 mg/m ²	1	4,44	0,003 - 0,33	0,317-39,600	[164]	0,071 -8,929
Hydroxyurea	15 mg/m ²	2	630,00	0,333 - 41,66	23,996-2999,520	[165]	0,038 -4,761
Topotecan	1.2 mg/m ²	3	2,49	0,007 - 0,83	0,054-6,718	[166]	0,022 -2,693
Etoposide	100 mg/m ²	4	221,76	0,133 - 16,66	9,596-1199,520	[150]	0,043 -5,409
Asparaginase	30000 IU/m ²	8	26,56	0,033 - 4,17	2,400-299,952	[167]	0,090 -11,294
Bortezomib	1.45 mg/m ²	40	21,62	0,007 - 0,83	0,480-59,976	[168]	0,022 -2,774
Prednisolone	1 mg/kg/day	3	41.58	0,16666 - 20,83	11,998-1499,760	[169]	0,289 -36,069

4.1.3. Fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi teszt

A testüregi B-sejtes sejtvonalak in vitro gyógyszerérzékenységének meghatározását három napos kultúrákon végeztük 384 lyukú lemezek (Greiner, Germany) felhasználásával. 27 gyógyszert vizsgáltunk négy különböző koncentrációban (1x, 5x, 25x, 125x) triplikátumban. Minden lyuk 9000 sejtet tartalmazott 30 μ l sejtszuszpenzióban. Három napos inkubációt követően az élő és az elpusztult sejtek megkülönböztetésére VitalDye (Biomarker, Hungary) fluoreszcens festéket használtunk (11. ábra). Az élő és az elpusztult sejtek pontos meghatározása a stockholmi Karolinska Intézetben (Karolinska Institute core Visualization Facility; KIVIF) egyedileg összeállított automatizált lézer fluoreszcens konfokális mikroszkópjával történt. A képeket a QuantCapture 4.0 számítógépes program segítségével rögzítettük, a képeken az élő és az elpusztult sejtek számát a QuantCount 5.0 számolóprogram segítségével határoztuk meg. Mindkét program az OpenLab (Improvision) programhátteret használva a Karolinska Intézetben (KIVIF) lett kifejlesztve. Tizenöt kontrollként használt lyuk csak sejtszuszpenziót tartalmazott 50nL DMSO-val, öt lyuk csak sejtszuszpenziót DMSO nélkül. A kéttípusú kontrollt összehasonlítva DMSO által okozott toxikus hatást nem tapasztaltuk. Az átlag túlélést (mean cell survival; MCS) a 11 BC sejtvonal túlélési átlagából határoztuk meg.



11. ábra. A 384 lyukú gyógyszerérzékenységi lemez sematikus képe látható a legfelső képen, amely 30 különböző gyógyszert tartalmaz 4 hígításban (1x, 5x, 25x, 125x) triplikátumban. A középső képen 3 napos inkubáció után VitalDye festék eleggyel megfestett sejtek láthatóak egy adott gyógyszer esetén konfokális adatrögzítés után. A legalsó kép adott régió felnagyított képe, ahol a sárga az élő sejteket, a kék az elpusztult sejteket jelöli.

4.2. Hazai HHV-8 törzsek filogenetikai vizsgálata

4.2.1. Klinikai minták

Összesen 17 betegtől 36 formalin-fixált paraffinba ágyazott preparátumot vizsgáltunk. Egy betegtől több minta is rendelkezésünkre állt, melyek különböző időpontokban lettek véve. A *Kaposi sarcomás* betegek a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikáján feküdtek. A betegek nemek szerinti eloszlása 14 férfi és 3 nő, átlag életkoruk 68,9 év (38-86). A betegektől szövetmintát vírusvizsgálat szempontjából kapott a Mikrobiológiai Intézet.

4.2.2. Sejtkultúra

Vizsgálatainkban a HHV-8-at látenszen hordozó BCBL-1 testüregi lymphoma sejtvonalat használtuk pozitív kontrollként. A sejtvonalat 10% borjúsavóval (FCS, Sigma), 2 mM L-glutaminnal (Sigma), 100 µg/ml streptomycinnel és 100 IU/ml penicillinnel kiegészített Dulbeccos Medium Eagle's MEM (DMEM, Sigma) tápfolyadékban tartottuk fenn.

4.2.3. DNS preparálás paraffinba ágyazott metszetből

Minimum 3-4 szelet 20 µm vastagságú metszetek álltak a rendelkezésünkre. A mintákat xilollal történt deparaffinálás után (az anyag mosása 2x1 ml xilollal, vízfürdő 50°C, 10 perc majd 2x1ml ethanollal szárítás) emésztettük 200 µl proteinsase K lysis pufferban (100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 1% sodium dodecyl sulfate, 25 mmol/l EDTA, pH 8.0 and 200 µg/ml proteinase K 1 óra 70°C). Majd az üledéket 0,1 N NaOH oldatban hidrolizáltuk 95°C-n 10 percig.

200 µl szérum, illetve plazma mintához 20 µl proteináz-K-t és kétszeres mennyiségű (400 µl) lízispuffert (100 ml-re: 0,2 M Tris-HCl, 25mM EDTA, 0,3 M NaCl, 2% SDS, DEPC kezelt desztillált víz) adtunk. Vortexelés után 1,5 órát inkubáltuk rázó vízfürdőben 55°C-on. A proteináz-K enzimet 5 perc inkubációval 95°C-on degradáltuk. Ezután fenol:kloroform 1:1 arányú keverékét adtuk hozzá (310 µl + 310 µl), majd alapos vortexelés után 15 percig centrifugáltuk 13.000 rpm-en. A felülúszóhoz (600 µl) azonos mennyiségű kloroformot adtunk, majd vortexelés és centrifugálás (15 perc, 13.000 rpm) után szintén a felülúszóhoz azonos mennyiségű (600 µl) izopropanolt adtunk és -20°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Centrifugálást követően (15 perc, 13.000 rpm) 400 µl 70%

alkohollal mostuk az üledéket. Újabb centrifugálás (15 perc, 13.000 rpm) után az üledéket szárítottuk és 25µl DEPC-cel kezelt desztillált vízben reszuszpendáltuk.

4.2.4. PCR

A PCR vizsgálatokat GeneAmpR PCR System 2700 (Applied Biosystem) gépben végeztük. Minden egyes amplifikálásnál pozitív és negatív kontrollokat is használtunk. Pozitív kontrollként BCBL-1 sejttenyészetből kivont HHV-8 DNS-t alkalmaztunk. A negatív kontrollhoz a minta DNS helyett desztillált vizet adtunk.

4.2.5. Oligonukleotidok

A PCR reakcióban használt oligonukleotidokat – amelyek a 5. táblázatban láthatóak - a Biocenter cég szintetizálta számunkra.

5. táblázat. A különböző PCR reakciókban használt primerek

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')	Termék (bp)	Referencia
Orf26	K1	AGC CGA AAG GAT TCC ACC AT	233	[3]
	K2	TCC GTG TTG TCT ACG TCC AG		
	INK1	GTG CTC GAA TCC AAC GGA TT	172	[43]
	INK2	ATG ACA CAT TGG TGG TAT AT		
K1	K1-N	ATG TTC CTG TAT GTT GT	867	
	K1-C	GTA CCA ATC CAC TGG TT		
	K1-N	ATG TTC CTG TAT GTT GT	498	
	K1-2B	TTG ACA GGC GAG ACG ACA GC		[170]
	K1-1	ACG CCT TAC ACG TTG ACC TG	239	
	K1-2A	ACA TGC TGA CCA CAA GTG AC		
	K1-1	ACG CCT TAC ACG TTG ACC TG	400	
	K1-2B	TTG ACA GGC GAG ACG ACA GC		
β-globin	PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	110	[171]
	PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC		

4.2.6. A PCR mixek összetétele és reakció körülményeik

A PCR reakcióelegyhez JumpStart RedTaq® ReadyMix™-et (Sigma Aldrich, Hungary) használtunk, mely mix előre tartalmazza a deoxynukleotidokat (dNTP), valamint a Taq polimerázt. A mintából 2,5 µl-t adtunk az első, 1,5 µl-t a második körben az elegyhez. A PCR reakciólegy minden esetben a következő tartalmazta: 6,25 µl JSRTRM, 3,25 illetve 4,25 µl desztillált víz, 0,25 µl primer 50 pmol /µl primer F, 0,25 µl primer 50 pmol /µl primer R. A reakció körülményei a 6. táblázatban láthatóak.

6. táblázat. Az amplifikáció körülményei a különböző PCR teszteknel.

	ORF26 1-2 kör PCR	ORF K1 1 kör	ORF K1 nested PCR (K1- N/2B, K1- 2A/B)	β-globin PCR
	95°C 3 perc	95°C 5perc	95°C 3 perc	95°C 3 perc
Denaturáció	95°C 30 sec	95°C 30 sec	94°C 30 sec	95°C 30 sec
Primer kapcsolódás	58°C 1 perc	55°C 1 perc	58°C 30 sec	55°C 1 perc
Lánchosszabbítás	72°C 1 perc	72°C 1 perc	72°C 45 sec	72°C 1 perc
Ciklusszám	30	30	35	40
Lánchosszabbítás	72°C 4 perc	72°C 4 perc	72°C 4 perc	72°C 4 perc

4.2.7. Agaróz gélelektroforézis

A PCR-termékek mennyiségét és méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1,5%-os (Promega) gélben, melyet 0,5-szörös töménységű TBE-pufferrel készítettünk. A PCR-termékekből 2,5 µl-t mértünk a gélbe, az elektroforézis 0,5-szörös TBE-pufferben 100 V feszültség mellett történt 40 percen keresztül. A kapott fragmentumok méretének viszonyításához 1 kbp-os molekulatömeg markert használtunk (Promega, Hungary). A gélt az elektroforézist követően 1,5 mg/ml ethídium-bromid oldattal festettük, mostuk,

majd a DNS-t UV-lámpa segítségével tettük láthatóvá. Archíváláshoz a gélt Kodak Digital Science DC120 kamerával fényképeztük.

4.2.8. Szekvenálás

A PCR termékek tisztítása a szekvenáláshoz MICROCON YM-100 (Millipore CO., Bedford, USA) tisztító oszloppal történt. Az K1-N-2B seminested primerek PCR termékek szekvenciáját a BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) felhasználásával határoztuk meg. A szekvenálási PCR reakció elegy 20 µl ösztérfogatban a következőket tartalmazta: 4 µl 5x szekvenálási puffer, 4 µl BigDye ReadyMix, 1 µl 3,3 pmol/ µl primer, 3 µl desztillált víz és 8 µl PCR termék. A szekvenálási PCR termék tisztítása SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns (Sigma Aldrich, Hungary) tisztító oszlopon történt. A szekvenálás ABI Prism 3130 kapilláris elektroforézis készülék (Genetic Analyser automata szekvenáló, Applied Biosystems) segítségével történt bér munka keretében a KBMPI (Debreceni Egyetem) kutatóközpontban.

4.2.9. Szekvencia – és filogenetikai analízis

A szekvenálás eredményét vizuálisan ellenőriztük az esetleges hibák kiszűrése végett. A szekvenciák illesztéséhez a Lasergene programcsomag (DNASTAR Inc, Madison, WI, USA) Megalign programot használtuk, mely a Clustal algoritmust alkalmazza [172]. A módszer lehetőséget nyújtott a törzsek közötti genetikai távolság meghatározásához és a nukleinsav szekvenciákból származtatott aminosav szekvenciák elemzésére. A nukleotid szekvenciákat az ExPASy (Bioinformatics Resource Portal, <http://web.expasy.org/translate/>) programmal fordítottuk fehérje szekvenciákra.

A filogenetikai törzsfát a phylogeny.fr segítségével konstruáltuk, melyhez a távolság mátrix alapú neighbor-joining algoritmust [133] alkalmaztuk. Az evolúciós távolság alulbecslésének kiküszöbölése érdekében a Kimura két-paraméteres korrekciós modellt [134] alkalmaztuk, mely különbözőképpen értékeli a statisztikailag gyakrabban előforduló tranzíciót (purin-purin, illetve pirimidin-pirimidin csere), és a ritkábban bekövetkező transzverziót (purin-pirimidin, illetve pirimidin-purin csere). A törzsfák megbízhatóságát 100 „bootstrap” értékkel ellenőriztük [173]. A törzsfát a DrawTree (version 1.6.6) programmal tekintettük meg.

5. EREDMÉNY ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak gyógyszerérzékenységi vizsgálata

11 különböző BCBL sejtvonalat vizsgáltunk egy speciális fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat segítségével. Az egyes vonalak klinikai és virális jellemzőit a 3. táblázatban foglaltam össze. Minden egyes sejtvonalat 27 klinikumban is használt gyógyszerrel szemben teszteltük, négy különböző koncentrációban, triplikátumban 384 lyukú lemezen. 3 nap inkubálás után az élő és döglött sejteket megfestettük speciális festék keverékkel, majd minden lyukat lefényképeztünk. Egy erre kifejlesztett programmal megszámláltuk a sejteket. Az egyes lyukakhoz a túlélő sejtek százalékos arányát úgy számítottuk, hogy összehasonlítottuk az élő sejtek számát az adott a kontroll lyukak (kezeletlen) átlagával.

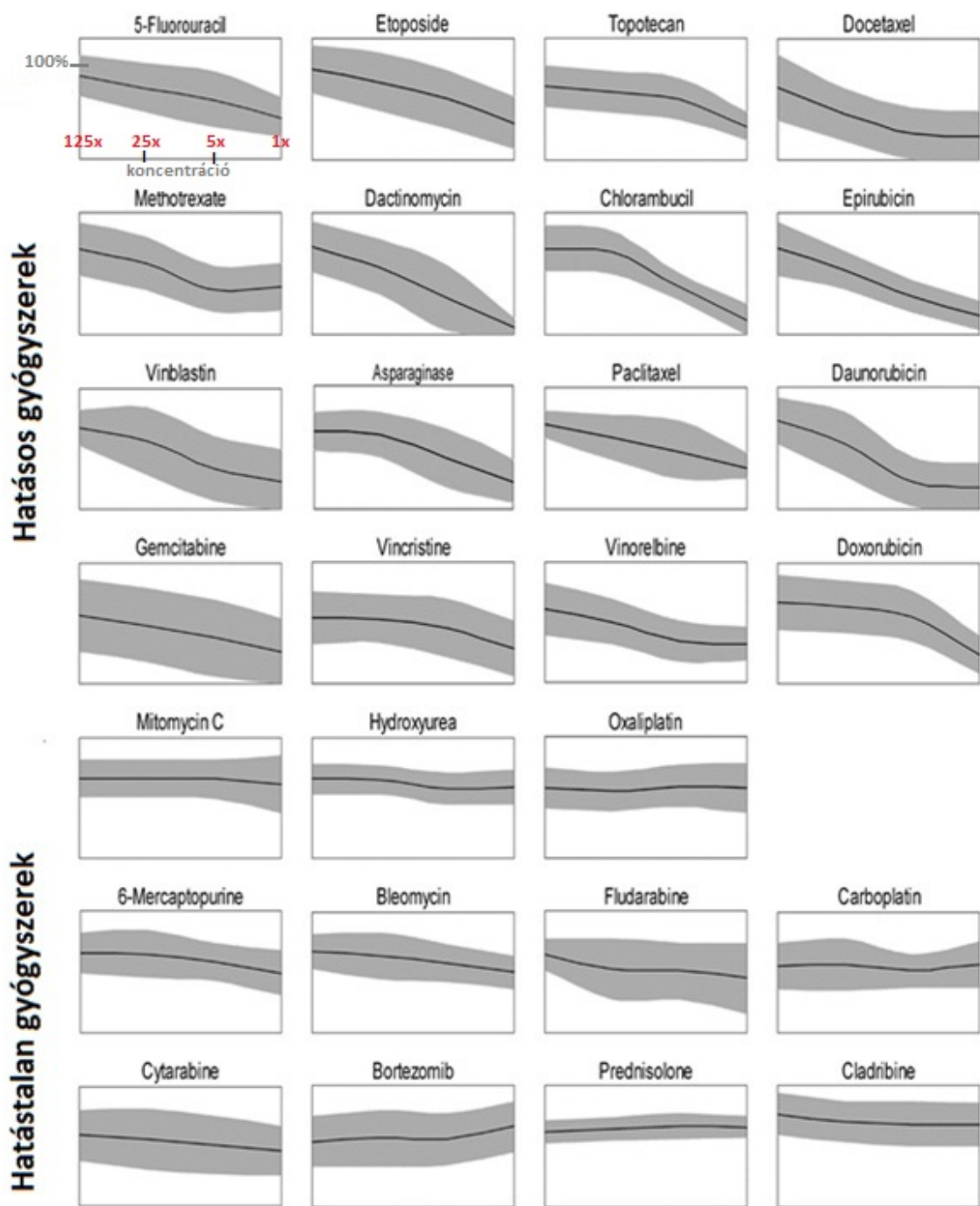
5.1.1. A hatásos és hatástalan gyógyszerek kiválasztása

A gyógyszer hatásosságát minimum 50% sejtölésnél határoztuk meg. A 7. táblázatban látható egyszerűen összefoglalva a gyógyszerek hatása, ahol a “++++” jelöli a leghatásosabb gyógyszert, azaz mind a négy különböző koncentrációnál 50%-nál nagyobb sejtpusztulás történt, a “+++” esetében a legtöményebb hígításnál nem érte el a 50%-nál nagyobb sejtpusztulást de az ennél hígabbnál igen, “++” ahol a két legkoncentráltabb lyukban történt 50%-nál magasabb sejtölés, “+” ahol csak a legtöményebb gyógyszer ölte meg a sejtek több mint felét és “R”, ami a rezisztenciát mutatja az adott gyógyszerre, hiszen a túlélés %-a 50 felett van minden esetben. A 12. ábra mutatja a sejt túlélés átlaggörbéit standard deviációkkal a 27 gyógyszer esetén. Az ehhez tartozó értékek a 8. táblázatban olvashatóak.

7. táblázat. A gyógyszerhatás sematikus összefoglalása

DRUG	BC-1	BC-2	BC-3	BCBL-1	BCP-1	CROAP-2	CROAP-3	CROAP-5	CROAP-6	HBL-6	JSC-1
5-Fluorouracil	++	R	R	++	+	+	+	++	+	R	R
6-Mercaptopurin	R	R	R	R	R	R	+	R	R	R	R
Asparaginase	++	++	++	+	+	+	+	+	R	R	R
Bleomycin	++	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Bortezomib	R	R	R	+	R	R	R	R	R	R	R
Carboplatin	R	R	R	+	R	R	R	R	R	R	R
Chlorambucil	++++	++	+++	+	++	++	++	++	++	++	R
Cladribine	+++	R	R	+	R	R	R	R	R	R	R
Cytarabine	+++	R	R	++++	R	R	R	R	R	R	R
Dactinomycin	+++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	++
Daunorubicin	+++	+	++	+++	++	++	++	+++	++	R	+++
Docetaxel	++++	+	R	++++	++	+++	++	+++	+++	+++	R
Doxorubicin	++++	+	R	+	+	+	++	+	+	++++	R
Epirubicin	++	++	+	++	+	++	++	+++	++	++++	+
Etoposide	++++	++	+	++++	+	+	++	++	++	+	R
Fludarabine	+++	R	+++	+++	R	R	+	R	R	R	+++
Gemcitabine	++++	++++	R	++++	+++	+++	+	++	+	R	R
Hydroxyurea	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R
Methotrexate	++++	++	R	+++	R	++	R	++	++	+	R
Mitomycin	++++	R	?	+	R	R	R	R	R	R	R
Oxaliplatin	R	R	?	R	R	R	R	R	R	R	R
Paclitaxel	++++	+	+	+++	+	++	++	+++	+++	+++	R
Prednisolone	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Topotecan	+	R	R	+	+	+	R	+	+	+	R
Vinblastin	++	++	R	+	++	++	+	+++	+++	+++	R
Vincristin	++++	R	R	++++	+	R	R	+	R	+	++++
Vinorelbine	+++	+	++	++++	++	+++	++	++++	++++	++++	++

R: rezisztens, ez a gyógyszer nem volt pusztító hatással a beteg tumor sejtjeire. +, ez a gyógyszer csak az 1x koncentrációval pusztította el a lyukban lévő sejtek minimum 50%-át. ++, ez a gyógyszer mind az 1x mind pedig az 5x hígításban elpusztította a lyukban lévő tumor sejtek minimum 50%-át. +++, ez a gyógyszer mind az 1x mind az 5x mind a 25x hígításban elpusztította a lyukban lévő tumor sejtek minimum 50%-át. ++++ négy plusz, ez a gyógyszer mind az 1x mind az 5x mind a 25x mind pedig a 125x hígításban elpusztította a lyukban lévő tumor sejtek minimum 50%-át.



12. ábra. A 11 BCBL sejtvonal gyógyszerérzékenységének átlag értékei és a standard deviációk 27 citosztikum esetében
 y tengely: a túlélősejtek %-os aránya 0-100%
 x tengely: gyógyszerhígítások (1x: legmagasabb koncentráció).

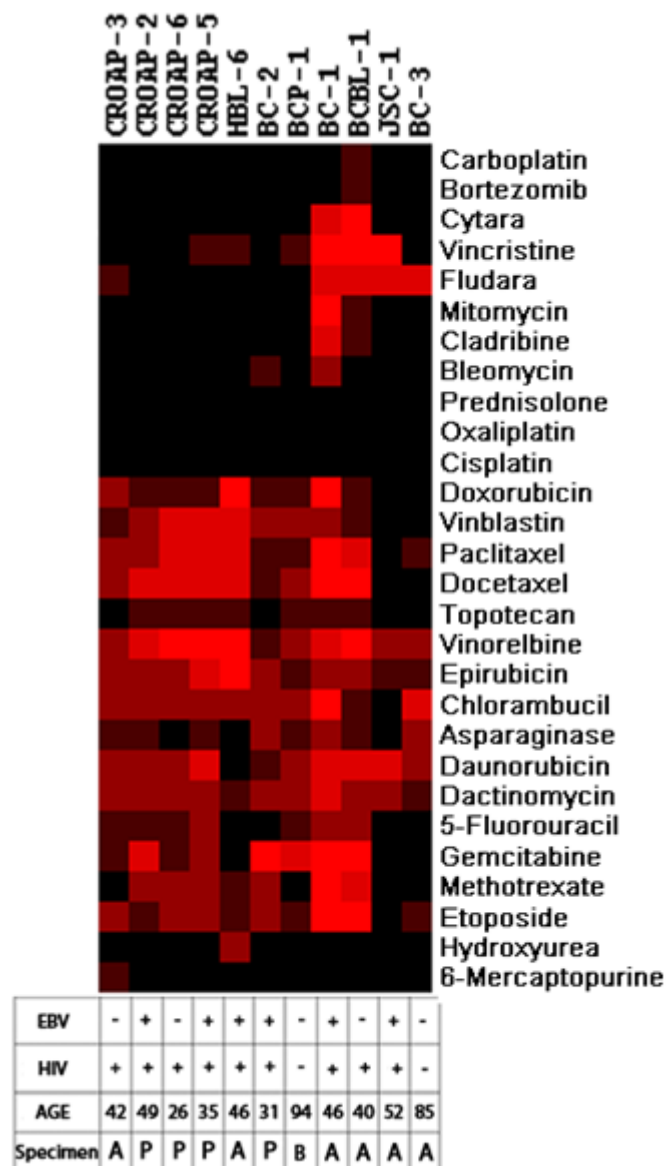
8.táblázat. A BCBL sejtvonalak MCS és QAUC értékei

	125x hígítás	25x hígítás	5x hígítás	1x hígítás	125x hígítás	25x hígítás	5x hígítás	1x hígítás	
Hatékony gyógyszerek	Chlorambucil								
	MCS	14,856	46,624	80,871	84,761				
	SD	15,397	12,997	21,033	22,011				
	QAUC	1,429	7,143	35,713	178,564				
	Paclitaxel								
	MCS	17,013	45,154	67,778	89,571				
	SD	24,016	49,553	35,926	22,008				
	QAUC	0,004	0,019	0,093	0,464				
	Daunorubicin								
	MCS	20,769	27,362	63,795	87,239				
	SD	25,022	24,181	31,542	23,070				
	QAUC	0,005	0,023	0,113	0,564				
	Vinorelbine								
	MCS	18,135	20,505	40,083	53,023				
	SD	16,878	21,508	22,627	26,510				
	QAUC	0,010	0,048	0,240	1,202				
	Asparaginase								
	MCS	33,415	62,328	90,611	94,435				
	SD	25,995	34,957	26,136	23,361				
	QAUC	0,090	0,452	2,259	11,294				
	Etoposide								
	MCS	30,614	50,213	64,271	74,694				
	SD	20,871	23,841	23,633	19,054				
	QAUC	0,043	0,216	1,082	5,409				
	Gemcitabin								
	MCS	31,437	45,979	58,407	67,999				
SD	33,036	38,512	37,053	36,657					
QAUC	0,050	0,247	1,237	6,184					
Vincristine									
MCS	43,840	69,193	80,209	81,667					
SD	34,721	35,897	29,982	32,620					
QAUC	0,309	1,546	7,727	38,636					
Nem hatékony gyógyszerek	Bortezomib								
	MCS	79,411	66,866	68,287	64,836				
	SD	25,473	25,667	28,021	24,955				
	QAUC	0,022	0,111	0,555	2,774				
	Cladribine								
	MCS	81,003	82,100	84,106	92,085				
	SD	21,267	22,017	20,163	21,322				
	QAUC	0,085	0,423	2,116	10,578				
	Oxaliplatin								
	MCS	87,016	89,315	82,687	86,885				
	SD	30,331	26,741	24,194	25,631				
	QAUC	0,009	0,044	0,222	1,109				
	Prednisolone								
	MCS	98,984	99,811	95,699	92,901				
	SD	12,798	15,573	14,201	14,033				
	QAUC	0,289	1,443	7,214	36,069				
	Hydroxyurea								
	MCS	88,879	86,332	97,596	98,858				
	SD	21,547	19,857	17,561	18,722				
	QAUC	0,038	0,190	0,952	4,761				
	Fludarabine								
	MCS	67,013	76,185	79,204	95,865				
	SD	43,034	35,334	37,691	19,681				
	QAUC	0,433	2,165	10,822	54,112				
		Epirubicin							
		MCS	19,264	37,382	63,503	85,146			
	SD	14,612	16,338	19,262	26,769				
	QAUC	0,002	0,008	0,040	0,199				
	Dactinomycin								
	MCS	7,935	36,012	67,016	86,794				
	SD	8,444	31,440	26,859	24,441				
	QAUC	0,027	0,134	0,668	3,340				
	Docetaxel								
	MCS	19,738	21,973	37,606	59,533				
	SD	21,033	20,342	21,171	27,023				
	QAUC	0,192	0,962	4,808	24,040				
	Vinblastin								
	MCS	26,843	40,997	67,939	81,099				
	SD	32,984	31,913	33,518	17,218				
	QAUC	0,028	0,140	0,702	3,510				
	Fluorouracil								
	MCS	41,116	58,913	70,312	83,034				
	SD	19,131	27,234	23,401	19,899				
	QAUC	0,346	1,731	8,657	43,283				
	Doxorubicin								
	MCS	29,093	66,865	77,208	80,770				
	SD	19,196	25,011	26,096	27,323				
	QAUC	0,001	0,004	0,022	0,110				
	Methotrexate								
	MCS	47,154	44,921	70,076	84,266				
	SD	22,463	21,690	25,475	25,439				
	QAUC	0,019	0,096	0,481	2,405				
	Topotecan								
	MCS	41,805	75,332	84,105	90,791				
	SD	16,468	24,537	25,281	25,370				
	QAUC	0,022	0,108	0,539	2,693				
	Bleomycin								
	MCS	60,373	69,342	76,509	80,843				
	SD	16,732	18,871	22,720	16,895				
	QAUC	0,017	0,087	0,433	2,165				
	6-mercaptopurin								
	MCS	74,020	87,868	97,133	98,233				
	SD	28,377	23,338	30,086	25,386				
	QAUC	0,289	1,443	7,215	36,073				
	Cytarabine								
	MCS	69,979	77,220	83,506	89,054				
	SD	31,215	36,265	38,638	32,516				
	QAUC	0,043	0,216	1,082	5,409				
	Mitomycin								
	MCS	73,404	79,238	80,057	79,413				
	SD	28,553	19,762	18,733	19,313				
	QAUC	0,071	0,357	1,786	8,929				
	Carboplatin								
	MCS	113,387	103,299	113,434	110,179				
	SD	39,298	27,434	43,524	38,643				
	QAUC	0,001	0,004	0,018	0,090				

5.1.2. Klaszteranalízis

Annak érdekében, hogy szisztematikusan össze tudjuk hasonlítani a sejtvonalak érzékenységét egymással minden egyes gyógyszer esetében, elvégeztük az adatainkkal a hierarchikus, euklideszi távolságmérésen alapuló klaszter analízist (Cluster 3.0, MacOS X) az egyszerűsített hatóanyag érzékenységi adatokkal. A klaszteranalízis egy olyan dimenziócsökkentő eljárás, amellyel adattömböket tudunk homogén csoportokba sorolni, klasszifikálni. Ezeket a csoportokat nevezzük klasztereknek. Az egyes klasztereken belüli adatok valamilyen dimenzió szerint hasonlítanak egymáshoz, és e dimenzió mentén különböznek a többi klaszter elemeitől. A csoportosítás alapját különböző távolság- vagy hasonlóságértékek képezik. A klaszterelemzés algoritmusai lehet hierarchikus vagy nem hierarchikus. A hierarchikus algoritmus az új klasztereket az előzőleg kialakított klaszterek alapján keresi meg, míg a nem hierarchikus algoritmus egyszerre határozza meg az összes klasztert. A klaszteranalízis ereje a mintaszámmal nő, esetünkben a 11 darab sejtvonallal még az értékelhetőség határán van.

Az eredményeket a TreeView segítségével vizualizáltuk [174]. A gyógyszerek érzékenységét egy ötlépéses skálán numerizáltuk, ahol minden lépés reprezentált egy számot (a legérzékenyebb 4, a rezisztens 0, stb). A klaszteranalízis grafikus ábrázolása a 13. ábrán látható, mely alatti táblázatban feltüntettük a sejtvonallal EBV illetve HIV státuszát, az eredetét, valamint a beteg életkorát, összefüggést keresve ezen adatok és a gyógyszerérzékenységi mintázat között. Jól látható az ábrán, hogy a legjobban hasonlító gyógyszerek, valamint sejtvonalak egymás mellé kerültek. A BC-1, valamint BCBL-1 sejtvonalak érzékenységi mintázata áll egymáshoz a legközelebb. Valamint a gyógyszerhatás szemszögéből elemezve az ábrát, látható, hogy az anthracyclinek csoportja hat a legjobban.



13. ábra. Az egyszerűsített gyógyszerérzékenységi adatokból készült hierarchikus cluster analízis. A táblázatban látható néhány adat a sejtvonalról, EBV és HIV státusz, a beteg életkora, valamint a minta eredete (A: ascites folyadék, P: pleurális folyadék, B: perifériás vér). A szín intenzitása mutatja az adott gyógyszer érzékenységet. A fekete rezisztens, a piros szín intenzitása arányos a gyógyszer hatékonyságával.

5.1.3. Farmakokinetikai összehasonlítás

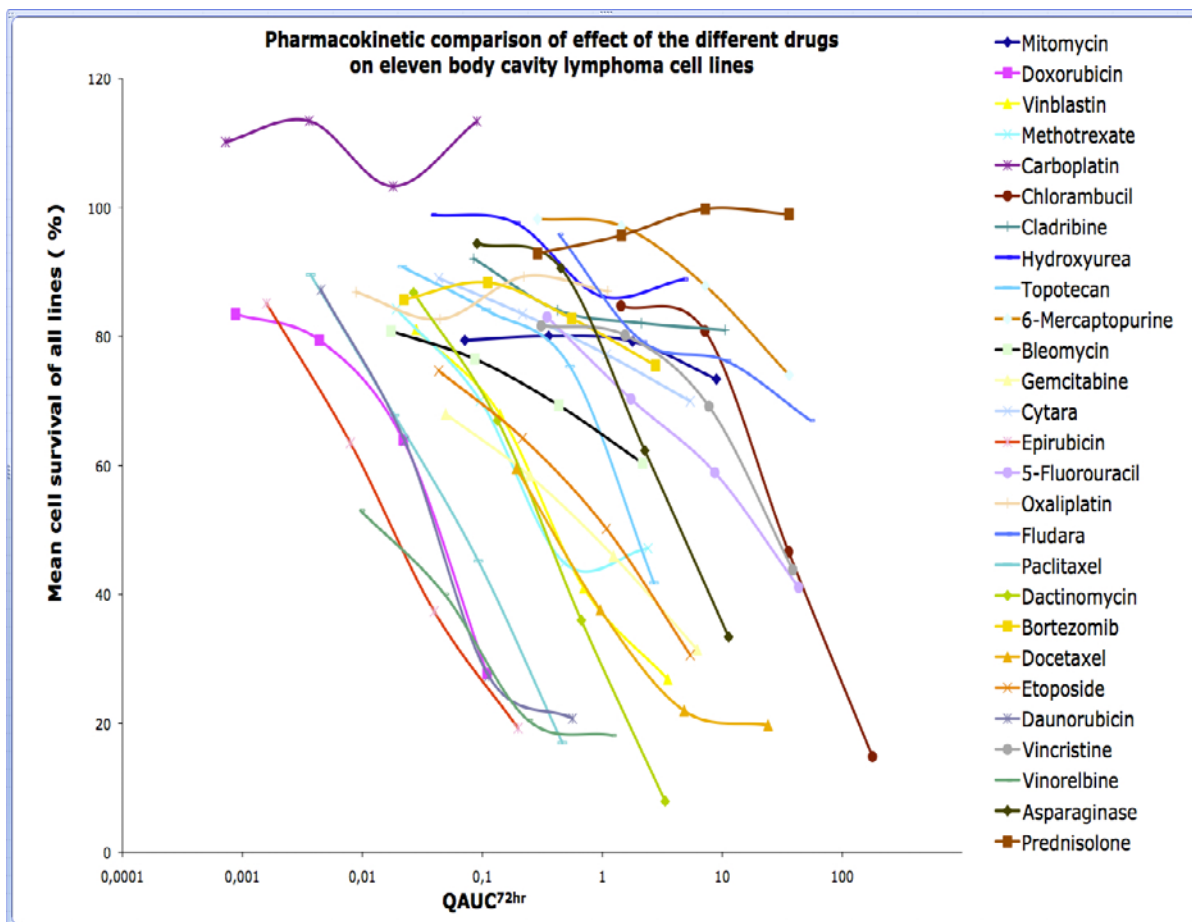
A gyógyszerek hígítási sorainak legmagasabb koncentrációit (1x, 5x, 25x, 125x) azok oldhatósága határozza meg. Az in vitro gyógyszerérzékenységi adatoknak viszonylag kevés klinikai jelentősége van, ha azok nem korrelálnak a klinikailag elérhető in vivo koncentrációkkal. Annak érdekében, hogy az kapott adatok összehasonlíthatóvá váljanak a

klinika gyógyszerdózissal, létrehoztuk a QAUC (Quotient of the Area Under Curve $QAUC^{72hr}$) értéket, mely meghatározása a következőképpen történt:

$$in\ vitro\ használt\ koncentráció \times 72\ óra\ (\mu g \times hr/ml) / in\ vivo\ AUC^{72hr}\ (\mu g \times h/ml)$$

Az *in vivo* $AUC^{72óra}$ meghatározásához gyógyszerenként kigyűjtöttük az irodalomban található klinikai dózist, valamint felezési időt és ebből kalkuláltuk a 72 órára vonatkozó valódi biológiai értékülését a hatóanyagnak.

A gyógyszerenként és koncentrációként kiszámolt QAUC értékeket a 4. táblázat tartalmazza. A sejtvonalak túlélési görbéinek átlagát a QAUC értékek függvényében ábrázolva lehetővé vált az egyes gyógyszerek hatékonyságának összehasonlítása (14. ábra).



14. ábra. A 11 BCBL sejtvonal gyógyszerérzékenységének átlagértékei a QAUC (Quotient of Area Under Curve) értékek függvényében ábrázolva.

Amint a 14. ábrán látható a legtöbb tesztelt gyógyszer farmakológiailag a legrelevánsabb QAUC^{72hr} tartományban (1-hez közeli) található.

A görbék a következő információt szolgáltatják: a leghatékonyabb gyógyszerek a következők: daunorubicin, epirubicin, paclitaxel és vinorelbin (alacsony QAUC^{72óra} értékek alacsony túlélés mellett). A legtöbb BCBL sejtvonal érzékeny ezekre a gyógyszerekre.

Fontos kiemelni, hogy egyetlen anthracyclin származék, a doxorubicin része a terápiás protokollnak, melynek a BC sejtvonalakra mutatott hatása meglehetősen heterogén. 2 sejtvonal a 11-ből erősen érzékeny, míg 2 teljesen rezisztens a rendszer által elérhető maximális koncentrációnál (QAUC=0.11). Két sejtvonal (JSC-1 és BC-3) mutat kisebb érzékenységet a kemoterápiás gyógyszerekre, de ezekben az esetekben is hatásosnak bizonyult a daunorubicin, epirubicin és vinorelbin. A dactinomycin mutatja a legnagyobb ölés hatékonyságot a jelenlegi vizsgálatban. Azonban a QAUC^{72óra} kalkulációból látható, hogy a használt koncentráció magasabb, mint ami maximálisan elérhető a betegben.

Carboplatin használatakor relatív sejtszám növekedést tapasztalunk mind a 11 sejtvonal esetén a kontrollhoz képest, azaz a túlélés 100 % felett van. Ez a jelenség arra utalhat, hogy az alacsony dózisú carboplatin véd a spontán sejt haláltól.

5.1.4. A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak érzékenységével kapcsolatos megállapítások

A body cavity lymphomák biológiai tanulmányozása az in vitro körülmények között növekvő sejtvonalak segítségével lehetséges. Az általunk használt sejtvonalak különböző eredetűek, melyek testüregi B-sejtes lymphomás betegek asciteséből, testüregi folyadékából, valamint perifériás vérből lett előállítva. Eredményeink azt mutatják, hogy a BC sejtvonalak gyógyszerérzékenységei mintázata a sejtek eredetétől függetlenül megegyezik. Egyedül egy sejtvonal mutatott viszonylag nagyobb rezisztenciát, míg 2 sejtvonal (BC-1 és BCBL-1) erősen érzékeny minden tesztelt gyógyszerre.

A kapott eredmények alapján a BC sejtvonalak egy közös érzékenységi profilt mutatnak. Ezek mintázatok nem mutatnak egyértelmű összefüggést a lymphomák biológiai vagy

klinikai hátterével. A gyógyszerérzékenységek klaszter analízise során nem látható összefüggés az EBV, HIV státusszal, az anatómiai lokalizációval, az életkorral, vagy a betegség lefolyásának a gyorsaságával. 2 sejtvonal (BCP-1 és BC-3), melyek HIV negatív betegből származnak, viszonylag kisebb gyógyszerérzékenységi mintázatot mutatnak.

A jelenleg alkalmazott terápia az ABDV (doxorubicin, bleomycin, vinblastin, dacarbazin), a methotrexát kombinációja a CHOP-nal (cyclophosphamide, doxorubicin, prednisolone, vincristine), valamint előrehaladott stádiumú, rossz prognózisú esetekben szóba jöhet a BEACOPP alap dózisú protokoll (bleomycin, etoposid, doxorubicin, cyclophosphamid, vincristin, procarbazin, prednisolon). Az adataink a sejtvonalak változatos érzékenységét mutatta a methotrexatra, bleomycinre, doxorubicinra, etoposidra, vinblastinra és vincristinre, de prednisolonra teljesen rezisztensek voltak. Sajnálatos módon a cyclophosphamide és ifosfamid nem a vizsgálati lista tagja, ugyanis egyik gyógyszer sem aktív önmagában, mindkettőt a máj konvertálja aktív metabolittá (4-OH cyclophosphamide és chloroacetaldehyde).

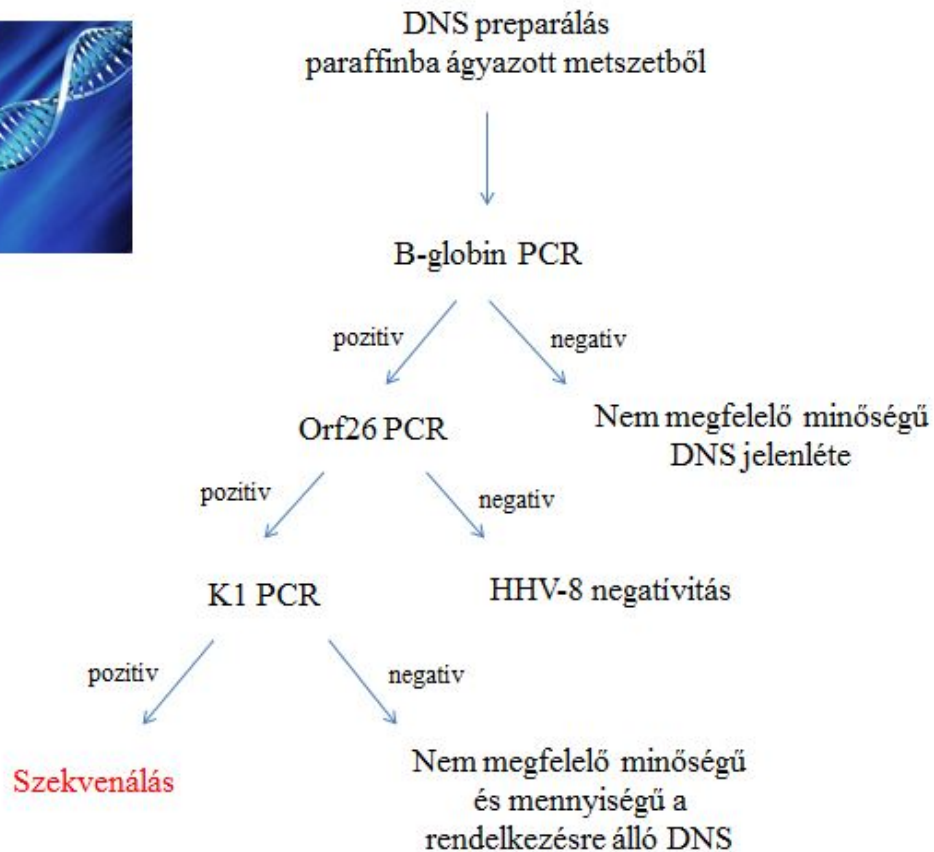
Korábban közölték, hogy a proteosoma inhibitor bortezomib apoptózist indukál BCBL-1 és BCP-1 sejtvonalak esetén. A méréseink során csak a BCBL-1 mutatott érzékenységet a bortezomibra és csak a legnagyobb koncentrációban.

Vizsgálataink szerint a BC sejtvonalak különösen érzékenyek a mikrotubulus ellenes szerekre és az anthracyclin származékokra. Habár mindkét említett csoport gyógyszerei mindegyik sejtvonalon mutatott dóziszfüggő sejtpusztulást, ha az in vitro használt gyógyszerkoncentrációt hasonlítottuk össze a legmagasabban elérhető plazmakoncentrációval (QAUC^{72óra}), az epirubicin, a daunorubicin, a paxlitacel és a vinorelbin bizonyult a leghatásosabbnak.

Eredményeink alapján javasoljuk a fent említett gyógyszerek használatát és beépítését a HHV-8 indukálta testüregi B-sejtes lymphoma betegségek során használt protokollokba. A gyógyszer válaszok heterogenitása miatt érdemes személyre szabott terápiát végezni minden beteg kezelése előtt.

5.2. Hazai HHV-8 törzsek filogenetikai vizsgálata

17 beteg 36 formalin-fixált paraffinba ágyazott KS pozitív preparátumán az orf-K1 génrégiót amplifikáltuk fel PCR segítségével és szekvenáltuk. Az alkalmazott PCR stratégia a 15. ábrán látható.



15. ábra. A PCR vizsgálatok stratégiája

5.2.1. HHV-8 pozitívítás vizsgálata orf26 PCR segítségével

A 34 kDa minor kapszid proteint kódoló orf26 régióra tervezett primerek, melyek egy 233 bp hosszúságú fragmentumot amplifikálnak fel nested PCR segítségével, a legáltalánosabban elterjedtek a HHV-8 DNS jelenlétének kimutatására. Ez a módszer bizonyul a legérzékenyebbnek is, ugyanis a HHV-8 pozitív KS mintákban már 3-10 kópia

kimutatható. 17 beteg 36 paraffinba ágyazott KS pozitív szövetmintájából nyert DNS esetén végzett PCR vizsgálat minden esetben pozitívást mutatott. Ezen eredményeinket mások is megerősítik, ugyanis Magyarországon végzett kutatások az AIDS-KS betegek szövetmintáinak 92%-ában, míg poszt-transzplantációs és klasszikus KS esetek mindegyikében kimutatták a HHV-8 DNS-t PCR technikával [175].

A HHV-8 DNS jelen van a KS léziók több mint 95%-ában [176], míg KS-ás betegek PBMC mintáinál kb 50%, a KS negatív betegeknél 8-13%-ban mutatták ki [177] Egy szövetminta negatív orf26 PCR eredménye nem zárja ki más szövetek HHV-8 fertőzését, ezért az antivirális ellenanyagok kimutatására szolgáló szerológiai vizsgálatok a legalkalmasabbak az epidemiológiai felmérésekre [178]. A PCR pozitív, ellenanyag negatív betegek esetében valószínűsíthető, hogy a fertőzés korai szakaszában detektáltuk a vírust, mielőtt az immunválasz indukálódott [179]. A HHV-8 kimutatása PBMC-ből látens infekcióra, míg szérumból és plazmából (nem-sejt asszociált HHV-8) aktív replikációra utalhat [180]. Reaktiváció vagy késői elsődleges fertőzés esetén mind a vírus ellenanyag, mind a vírus DNS kimutatható [2].

Eredményeink igazolják, hogy az orf26 nukleotid polimorfizmus vizsgálata szövetmintából hatékonyan bizonyul a HHV-8 DNS kimutatására.

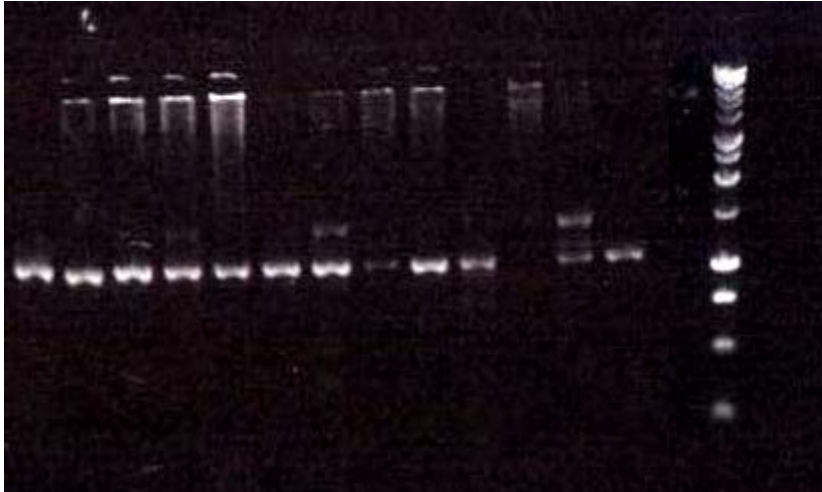
5.2.2. Az orf-K1 heminested PCR eredményei

Az orf-K1 régióra tervezett primerekkel a fent említett 17 beteg 36 mintáját vizsgáltuk meg és 12 esetben sikerült kimutatni HHV-8 orf-K1 DNS-ét (9. táblázat). Az optimalizálás BCBL-1-ből nyert DNS-sel történt (16. ábra).

9. táblázat. A különböző primer kombinációkkal a K1 gén régióra végzett PCR tesztekkel történt vizsgálat

Mintaszám	B-globin	Orf26	N-C	N-2B	Nk1-1-2B	Nk1-1-2A
Hun30a	+	+	+	+	-	-
Hun30b*			+	+	-	-
HUn30b*			+	+	-	-
Hun31a	+	+	+	+	-	-
Hun31b*			-	+	-	-
Hun31b*			-	+	-	-
Hun32	+	+	-	+	-	-
Hun33	+	+	-	+	-	-
Hun34a	+	+	-	+	-	-
Hun34b			-	+	-	-
Hun35	+	+	-	+	NTV	NTV
Hun36	+	+	-	+	NTV	NTV

+: sikeres amplifikáció, -: sikertelen amplifikáció, NTV: nem történt vizsgálat



16. ábra. K1-N és K1-2B primerekkel végzett seminested PCR. 1-12: betegminták, 13: pozitív kontroll, 14: negatív kontroll, M: marker

5.2.3. Az orf-K1 fragmentum szekvenálási eredménye

A HHV-8 pozitív KS szövetből izolált DNS szekvenciája alapján az orf-K1 A1, valamint A2 variánsai közé sorolhatóak a minták. Részletesen, a Hun30a, Hun30b, Hun31b, Hun32, Hun33, Hun34a az A1 szubtypussal, a Hun31a, Hun34b, Hun35, Hun36 az A2 szubtypussal mutat homológiát. Az orf-K1 szubtypusokat a 10. táblázat foglalja össze. Az A1 törzsbe tartozó nukleotid és aminosav szekvenciák 100% azonosságot mutatnak az A1 típusú K1/E25 és K177/47 prototípussal. Míg a Hun31a 96,5%, a Hun34b és Hun35 94,8%, míg a Hun36 93% azonosságot mutat a A2 típusú K1/E41 prototípussal aminosav szinten (17. ábra). A pontmutációk három esetben jártak aminosav cserével, a többi esetben “néma” mutáció történt (aminosavcserét nem okozó bázisváltozás).

10. táblázat. A KS pozitív betegek összesített szubttípus megoszlása a HHV-8 genom K1 régiója alapján.

Beteg	Élet -kor (év)	Nem	KS status	KS típusa	Minta	Betegszám	K1 szubttípus	Accession. No.
1	87	F	Cutaneous	Classic	Skin tumor biopsy 1	Hun30a	A1	KF829938
					Skin tumor biopsy 2	Hun30b*	A1	KF829939
					Skin tumor biopsy 3	Hun30b*		
2	85	M	Cutaneous	Classic	Skin tumor biopsy 1	Hun31a	A2	KF829940
					Skin tumor biopsy 2	Hun31b*	A1	KF829941
					Skin tumor biopsy 3	Hun31b*		
3	84	M	Cutaneous	Classic	Skin tumor biopsy	Hun32	A1	KF829942
4	82	M	Cutaneous	Classic	Skin tumor biopsy	Hun33	A1	KF829943
5	39	M	Visceral és cutaneous	Classic	Skin tumor biopsy 1	Hun34a	A1	KF829944
					Skin tumor biopsy 2	Hun34b	A2	KF829945
6	78	M	Cutaneous	Classic	Skin tumor biopsy	Hun35	A2	KF829946
7	88	M	Cutaneous	Posttransplant	Skin tumor biopsy	Hun36	A2	KF829947

*ugyanazon beteg különböző időpontjában levett minta, a szekvenciák nukleotid sorrendje 100% azonosságot mutatott.

A Hun31 és Hun34 betegek két eltérő időpontban levett mintájából a HHV-8 két különböző orf-K1 variánsát identifikáltuk. Az első mintájának (Hun31a) szekvenciája A2 variánsúnak bizonyult, míg a másik időpontban levett minta A1, a Hun34 betegnél ugyanezt tapasztaltuk. Az orf-K1 eredményeinkhez hasonlóan több munkacsoport személyen és mintán belüli genotípusos különbséget talált KS léziók, vér és szájüregi minták orf73, orf K1 és orf26 fragmentumok szekvenálása során. [181], [182]. Cook és munkatársai egy afrikai betegben A4 és B1 orf-K1 szubttípusokat identifikáltak [183]. Habár úgy tűnik, hogy egy betegben egyetlen HHV-8 variánssal történő fertőződés dominál, azonban a rekombináns genomok izolálása felveti a különböző szubttípusokkal történő egyidejű fertőzés lehetőségét. Azonban mások nem igazolták ezen eredményeket, ugyanazon beteg több mintájában nem találtak variabilitást [184], [55]. Mivel úgy tűnik, hogy a K1 gén nem variálódik egy fertőzött személy életében, ezért valószínűsíthető, hogy

a betegek többszörösen fertőződtek a HHV-8 különböző törzsével. Jelenleg még nem tudjuk, hogy ez koinfekció, reaktiváció vagy szuperinfekció következménye [182].

A Hun30a, Hun30b, Hun31a, Hun31b, Hun32, Hun33, Hun34a, Hun34b, Hun35, Hun36 szekvenciákat elküldtük az NCBI GenBank adatbázisába, regisztrációs számuk a következő: KF829938, KF829939, KF829940, KF829941, KF829942, KF829943, KF829944, KF829945, KF829946, KF829947.

K1-E25		LFRLTERTVF	PVNIACNFTC	VEQSGHRQSI	WITWHAQPVL	QTLCAQPSNT	VTCGQH	A1
K1-77/47		-----	-----	-----	-----	-----	-----	A1
Hun30a, Hun30b	}	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A1
Hun31b, Hun32		-----	-----	-----	-----	-----	-----	A1
Hun33, Hun34a		-----	-----	-----	-----	-----	-----	A1
K1-E41		-L-----FL	G-N-----	-----	-----	-----	-----	A2
Hun31a		-----LL	G-N-----	-----	-----	-----	-----	A2
Hun34b, Hun35		-----K-LL	G-N-ACNFTC	-----	-----	-----	-----	A2
Hun36		-----KK-LL	G-N-ACNFTC	-----	-----	-----	-----	A2

17. ábra. A saját és referencia törzsek (A1 és A2 szubtypusok) orf K1 gén fragmentumának aminosav szekvenciáinak illesztése.

5.2.4. Filogenetikai analízis

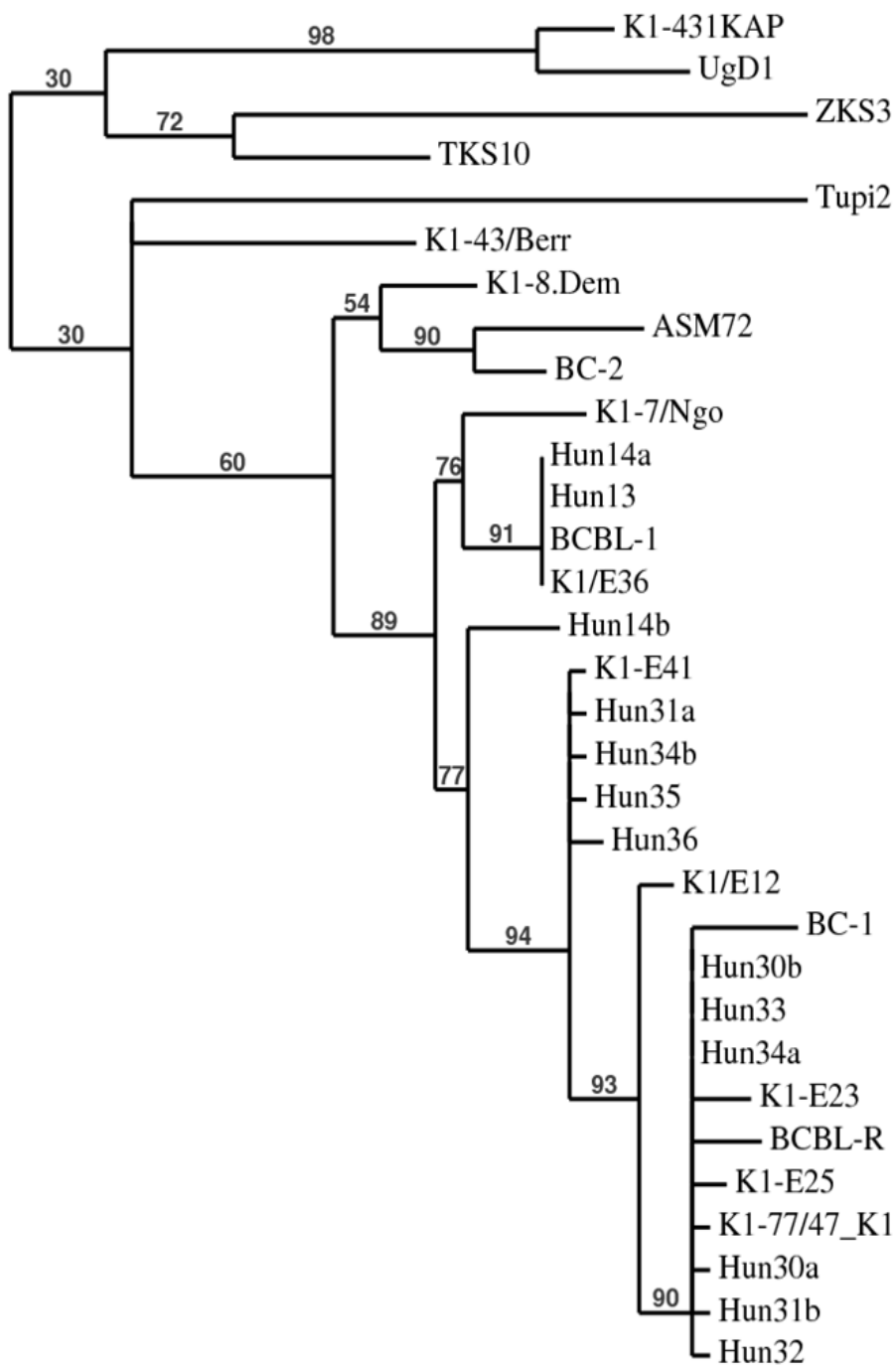
Az ORF-K1 gén 400 bp hosszúságú (VR1 régiót tartalmazó) fragmentumának szekvenálása elegendőnek bizonyult a filogenetikai analízishez, mint azt már Meng és munkatársai is igazolták [185], és egyenértékű a teljes gén alapján készített analízissel.

A K1 törzsek filogenetikai analíziséhez 19 referencia törzset választottunk, melyek szekvenciái a GenBank adatbázisából származnak: B1 (K1-431KAP, AF133040), B2, (UgD1, AF130292), D1 (TKS10, AF133043), D2 (ZKS3, AF133044), E (Tupi2, AF220293), C (K1-43Berr, AF178810), C (K1-8Dem, AF178780), C1 (ASM72, AF133041), C3 (BC-2, AF133042), A5 (K1-7/Ngo, AF178779), A3 (BCBL-1, U86667), A3 (K1/E36, AY204662), A2 (K1-E41, AY204657), A2 (K1/E12, AY204663), A2 (BC-1, U75698), A2 (K1-E23, AY204668), A1 (BCBL-R, AF133038), A1 (K1-E25, AY204654), A1 (K1-77/47, AF201850).. A, B, C, D, E a szubtypusokat jelöli.

Törzsfánk tartalmazza az eddig Magyarországon elvégzett K1 szekvencia eredményeket is [186].

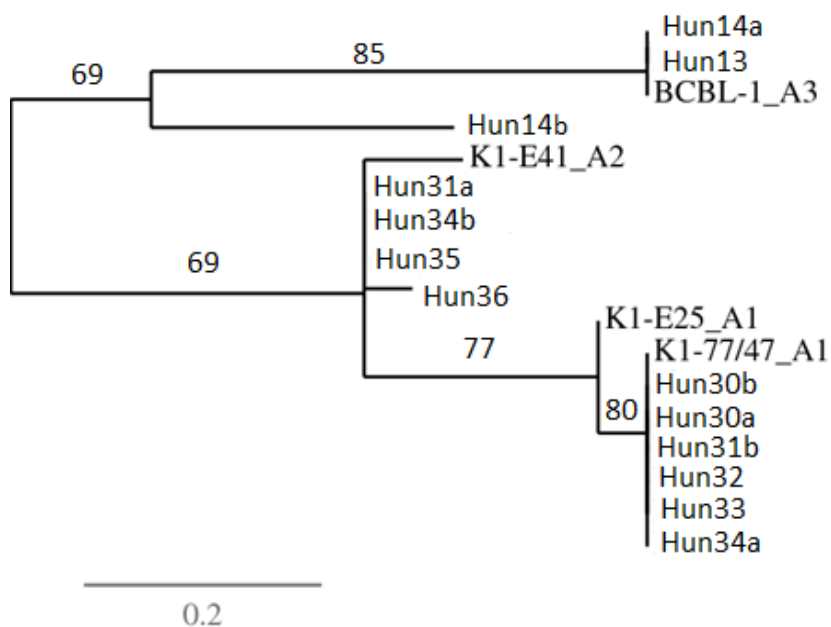
A genetikai távolságokat a Lasergene Megalign programmal becsültük meg, a Kimura 2-paraméteres modell alapján. A törzsfát (17. ábra) a phylogeny.fr honlap segítségével szerkesztettük, a megbízhatóságát 100 „bootstrap” értékkel ellenőriztük.

A filogenetikai analízis során 2 különböző set-et használtunk. Az első az összes szubtypust tartalmazza, míg a másik csak a közeli A típusokat (18, 19. ábra).



0.1

18. ábra. Az ORF-K1 gén egy a VR1 régiót tartalmazó fragmentumának nukleotid szekvenciája alapján készült törzsfá.



19. ábra. Az ORF-K1 gén egy a VR1 régiót tartalmazó fragmentumának aminosav sorrendje alapján készült törzsfája.

5.2.5. K1 törzsek evolúciójával és eredetével, hazai előfordulásával kapcsolatos megállapítások

17 betegtől 36 minta állt a rendelkezésünkre, azonban nehéznek bizonyult az K1 régió amplifikálása. 22 esetben (61%) sikerült seminested PCR-rel orf-K1 régiót amplifikálni. Ebből 12 amplicon bizonyult megfelelő minőségűnek mind tisztaságban, mind mennyiségben a szekvenáláshoz, tehát tapasztalataink szerint is az orf-K1 PCR-nek alacsony a hatékonysága. Ennek oka, hogy az ORF-K1 génen belüli nukleotid változások kb. 85%-a vezet aminosav cseréhez, ami arra utal, hogy a K1 gén pozitív szelekciós nyomás alatt evolválódott. Habár úgy tűnik, hogy betegenként az egyetlen HHV-8 variánssal történő fertőződés dominál, azonban több variáns detektálása felveti a különböző szubtypusokkal történő egyidejű fertőzés és rekombináns genomok kialakulásának lehetőségét.

Hayward és munkatársai feltételezik, hogy a HHV-8 egy ősi emberi vírus, mely ugyan világszerte elterjedt a migrációval, de etnikai és földrajzi különbségek megfigyelhetők. Az első hatalmas migráció 100.000 évvel ezelőtt indult a Szaharától délre fekvő afrikai régióba (B szubtípus), majd 60.000 évvel ezelőtt Dél-Ázsiába és Afrikába (D szubtípus). Végül kb 35.000 évvel ezelőtt 2 főág vándorolt Európába és Észak-Ázsiába (A és C szubtípus). A B szubtípus filogenetikailag ősbibnek tűnik és távolabbi rokonságban áll az A és C szubtípusokkal (28-44% protein szekvencia eltérés), mint az A és C szubtípus egymástól (12-24% eltérés fehérje szinten) [170]

Kínában KS-ás betegek szövetmintáiból [187], valamint orosz és görög KS betegekből A és C szubtípust mutattak ki [188] [189], Iránból a C típust jelentették [190]. Ugandában az A5, B1 és az új F törzsek előfordulásáról jelentek meg közlemények [191]. Zimbabweban az A5, B és a főként gyermek populációt fertőző Z szubtípus található meg [192]. Új-Caledóniából és a Salamon-szigetéről, ahol az endémiás KS megjelenése a jellemző, a D szubtípus tipizálása történt [193]. Peruban az A és C szubtípus dominál, melyet valószínűleg az európai bevándorlók (spanyol kolonizáció) szórtak szét, de találtak A5 és B törzseket is, melyet az afrikai rabszolgák jelenlétére utal. Ritka E típust is analizáltak, mely az amerindiánokra jellemző, a történelem folyamán ők hódították meg először ezt a régiót. Hasonló divergítás megfigyelhető Francia Guyanában is [194] [195].

Gazouli és munkatársai felvetették, miszerint kapcsolat lehet a KS kliniko-epidemiológiai típusa és a különböző szubtípusok között, de kevés minta állt a rendelkezésükre [196]. Továbbra is kérdéses, vajon egy bizonyos genotípus összefüggésbe hozható-e a KS (vagy egyéb HHV-8 asszociált betegségek) kifejlődésével vagy progressziójával, illetve a KS egy bizonyos kliniko-epidemiológiai formájával [2].

Jelen vizsgálataink során a különböző kliniko-epidemiológiai formájú KS betegek orf-K1 régió tipizálásával megállapíthatjuk, hogy a talált A szubtípus illeszkedik a régióban elterjedt törzsekhez, ám a viszonylag kevés mintaszám miatt a hazai HHV-8 törzsek genotípusainak meghatározásához további vizsgálatok szükségesek.

5.3. Az értekezésben szereplő új eredmények

1. Testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonal *in vitro* vizsgálata során kimutattuk, hogy a sejtvonalak eredetüktől függetlenül hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutatnak a több hatóanyagcsoportot felölelő citosztatikum sorozattal szemben.
2. Vizsgálataink szerint ezek a sejtvonalak különösen érzékenyek a mikrotubulusokra ható szerekre és az anthracyclin származékokra. *In vitro* gyógyszerérzékenységi eredményeink adatokat szolgáltatnak a jelenlegi empirikus terápia továbbfejlesztéséhez.
3. *Kaposi sarcomas* betegekből származó mintákban az orf-K1 génrégió szekvenálása alapján az HHV-8 szubtypusait identifikáltuk. Eredményeink alapján az A szubtypus, azon belül az A1 és A2 szubtypusok voltak azonosíthatóak. Két beteg mintájában az orf-K1 két különböző variánsát mutattuk ki.
4. A Kaposi sarcomás biopsziákban a régióban elterjedt törzsek egy részét lehetett kimutatni.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A humán herpesvírus-8 (HHV-8) a *Kaposi sarcoma* (KS) patogenezisében bizonyítottan etiológiai szerepet játszik, amelynek felfedezése óta 20 év telt. A vírust *AIDS-hez társuló testüregi B-sejtes lymphomák* esetén, valamint *multicentrikus Castleman-betegségben* is kimutatták. A malignus betegségben szenvedők kezelési eredményeinek javítása a jövőben a terápia agresszivitásának növelése helyett egyre inkább a személyre szabott terápiától várható. Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálatok segítségével meghatározott hatásos citosztatikumok alkalmazása javíthatja a betegség kimenetelét. A HHV-8 kutatás sokat köszönhet a testüregi B-sejtes lymphomának, ugyanis ez ebből eredő immortalizált sejtvonalak *in vitro* kultúrában könnyen fenntarthatóak és a vírust látens epizomális formában hordozzák.

11 BC sejtvonal *in vitro* gyógyszerérzékenységét vizsgáltuk kutatásaink során. Az élő és elpusztult sejtek számát automatizált lézer konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg. A sejtvonalak eredetüktől függetlenül hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutattak a 27 tesztelt citosztatikummal szemben. Vizsgálataink szerint a BC sejtvonalak különösen érzékenyek a mikrotubulusokra ható tumorelles szerekre és az anthracyclin származékokra, de ezek közül is az epirubicin, a daunorubicin, a paxlitacel és a vinorelbin bizonyult a leghatásosabbnak. Mivel a HHV-8 indukálta testüregi B-sejtes lymphoma viszonylag ritka betegség, nincs kialakult kezelési protokoll ezen betegség kezelésére, a B-sejtes lymphomák sémáját követik, mely a betegség stádiumától függően különböző polikemoterápiát javasol. Eredményeink alapján javasoljuk a fent említett gyógyszerek használatát és beépítését betegségek során használt protokollokba.

A HHV-8 orf-K1 membránprotein szokatlanul magas szintű genetikai variabilitását mutat, melyen a filogenetikai kutatások alapulnak, ez alapján a HHV-8 hét fő szubtypusát írták le: A, B, C, D, E, F és Z. Kutatásaink során az orf-K1 génrégiót amplifikáltuk fel PCR segítségével és szekvenáltuk hazai *Kaposi sarcomas* betegek mintáin. Összesen 17 betegből 36 formalin-fixált paraffinba ágyazott preparátumot vizsgáltunk. Az orf-K1 génrégió alapján az A szubtypust identifikáltuk, azonbelül az A1 és A2 szubtypust. Két beteg

mintájában az orf-K1 két különböző variánsát mutattuk ki. Az általunk végzett munka fontos adatokat szolgáltat a HHV-8 magyarországi elterjedéséről és eredetéről, mely alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgálatainkban talált szubtípusok illeszkednek a régióban elterjedt törzsekhez.

7. SUMMARY

The human herpesvirus 8 (HHV-8) is the etiologic agent in Kaposi's sarcoma which was discovered 20 years ago. It was found to be associated with some rare types of lymphoma in AIDS, namely body-cavity based lymphoma and the plasmablastic variant of multicentric Castleman's disease and some cases was shown in bone marrow samples of myeloma multiplex and benign monoclonal gammopathy disease. The survival of patients with malignant disease can be increased in the future using a more individualized therapy. Using of effective drugs determined by in vitro drug sensitivity test might result in a better clinical outcome.

As body cavity cell lines (BCBLs) are well established in vitro models for body-cavity based lymphoma we have assessed 11 BCBLs for cytotoxic drug sensitivity. The precise number of living and dead cells was determined using a custom made automated laser confocal fluorescent microscope. Independently from their origin, BCBLs showed very similar patterns against 27 frequently used cytostatic drugs. BCBLs were highly sensitive for epirubicin, daunorubicin, paclitaxel and vinorelbin.

The prognosis of PEL is poor, as the median survival in the previously published series does not exceed 6 months. Despite the improvement in therapeutical strategies during the last few years, there is no evidence of a cure for BCBL patients with conventional systemic chemotherapy addressed to aggressive NHL. Our data suggest that inclusion of the above drug into BCBL chemotherapy protocols may be justified.

Based on the sequence variation in the open reading frame (orf) K1, HHV-8 is now classified into subtypes A, B, C, D, E, F and Z. We attempted to develop a typing system based on amplification and sequencing of the K1 region. A total of 36 paraffin-embedded biopsies were tested in 17 patients. Based on the K1 region we identified subtype A within subtype A1 and A2. We determined different K1 strains in two specimens.

The main outcome is that it provides useful data for molecular epidemiological studies in Hungary and the found genotype is considered to originate from Europe.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE: **Risk factors for Kaposi's sarcoma in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine.** Zidovudine Epidemiology Study Group. *Arch Intern Med* 1994, **154**(5):566-572.
2. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM: **Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2003, **67**(2):175-212, table of contents.
3. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS: **Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma.** *Science* 1994, **266**(5192):1865-1869.
4. Strauchen JA, Hauser AD, Burstein D, Jimenez R, Moore PS, Chang Y: **Body cavity-based malignant lymphoma containing Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in an HIV-negative man with previous Kaposi sarcoma.** *Ann Intern Med* 1996, **125**(10):822-825.
5. Gaidano G, Castanos-Velez E, Biberfeld P: **Lymphoid disorders associated with HHV-8/KSHV infection: facts and contentions.** *Med Oncol* 1999, **16**(1):8-12.
6. Chen L, Lagunoff M: **Establishment and maintenance of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in B cells.** *J Virol* 2005, **79**(22):14383-14391.
7. Sin SH, Dittmer DP: **Viral latency locus augments B-cell response in vivo to induce chronic marginal zone enlargement, plasma cell hyperplasia, and lymphoma.** *Blood* 2013, **121**(15):2952-2963.
8. Verma SC, Robertson ES: **ORF73 of herpesvirus Saimiri strain C488 tethers the viral genome to metaphase chromosomes and binds to cis-acting DNA sequences in the terminal repeats.** *J Virol* 2003, **77**(23):12494-12506.
9. Yarmishyn A, Child ES, Elphick LM, Mann DJ: **Differential regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) by phosphorylation directed by the cyclin encoded by Murine Herpesvirus 68.** *Exp Cell Res* 2008, **314**(1):204-212.
10. Estep RD, Powers MF, Yen BK, Li H, Wong SW: **Construction of an infectious rhesus rhadinovirus bacterial artificial chromosome for the analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related disease development.** *J Virol* 2007, **81**(6):2957-2969.
11. Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, Garber R, Pellett PE, McGeoch DJ, Chang Y: **Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae.** *J Virol* 1996, **70**(1):549-558.
12. Grinde B: **Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response.** *J Oral Microbiol* 2013, **5**.
13. Swaminathan S: **Molecular biology of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** *Semin Hematol* 2003, **40**(2):107-115.
14. Sullivan R, Dezube BJ, Koon HB: **Signal transduction targets in Kaposi's sarcoma.** *Curr Opin Oncol* 2006, **18**(5):456-462.
15. Neipel F, Albrecht JC, Fleckenstein B: **Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity?** *J Virol* 1997, **71**(6):4187-4192.

16. Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y *et al*: **Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(25):14862-14867.
17. Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y, Knowles DM: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma**. *J Virol* 1996, **70**(11):8218-8223.
18. Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D: **The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions**. *J Virol* 1996, **70**(11):8151-8154.
19. Schulz TF: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis**. *J Antimicrob Chemother* 2000, **45 Suppl T3**:15-27.
20. Wilson SJ, Tsao EH, Webb BL, Ye H, Dalton-Griffin L, Tsantoulas C, Gale CV, Du MQ, Whitehouse A, Kellam P: **X box binding protein XBP-1s transactivates the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) ORF50 promoter, linking plasma cell differentiation to KSHV reactivation from latency**. *J Virol* 2007, **81**(24):13578-13586.
21. Xie J, Ajibade AO, Ye F, Kuhne K, Gao SJ: **Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency requires MEK/ERK, JNK and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways**. *Virology* 2008, **371**(1):139-154.
22. Blasig C, Zietz C, Haar B, Neipel F, Esser S, Brockmeyer NH, Tschachler E, Colombini S, Ensoli B, Sturzl M: **Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8**. *J Virol* 1997, **71**(10):7963-7968.
23. Stuber G, Mattsson K, Flaberg E, Kati E, Markasz L, Sheldon JA, Klein G, Schulz TF, Szekely L: **HHV-8 encoded LANA-1 alters the higher organization of the cell nucleus**. *Mol Cancer* 2007, **6**:28.
24. Komatsu T, Ballestas ME, Barbera AJ, Kaye KM: **The KSHV latency-associated nuclear antigen: a multifunctional protein**. *Front Biosci* 2002, **7**:d726-730.
25. Verma SC, Choudhuri T, Kaul R, Robertson ES: **Latency-associated nuclear antigen (LANA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with origin recognition complexes at the LANA binding sequence within the terminal repeats**. *J Virol* 2006, **80**(5):2243-2256.
26. Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Biberfeld P: **KSHV/HHV-8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development**. *Infect Agent Cancer* 2007, **2**:4.
27. Schalling M, Ekman M, Kaaya EE, Linde A, Biberfeld P: **A role for a new herpes virus (KSHV) in different forms of Kaposi's sarcoma**. *Nat Med* 1995, **1**(7):707-708.
28. Pyakurel P, Massambu C, Castanos-Velez E, Ericsson S, Kaaya E, Biberfeld P, Heiden T: **Human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma herpesvirus cell association during evolution of Kaposi sarcoma**. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004, **36**(2):678-683.
29. Dupin N, Del Giudice P: **Editorial commentary: treatment of Kaposi sarcoma in the highly active antiretroviral therapy era**. *Clin Infect Dis* 2008, **47**(3):418-420.
30. Belanger C, Gravel A, Tomoiu A, Janelle ME, Gosselin J, Tremblay MJ, Flamand L: **Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation**. *J Hum Virol* 2001, **4**(2):62-73.
31. Kaaya E, Castanos-Velez E, Heiden T, Ekman M, Catrina AI, Kitinya J, Andersson L, Biberfeld P: **Proliferation and apoptosis in the evolution of endemic and acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma**. *Med Oncol* 2000, **17**(4):325-332.

32. Ojala PM, Tiainen M, Salven P, Veikkola T, Castanos-Velez E, Sarid R, Biberfeld P, Makela TP: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded v-cyclin triggers apoptosis in cells with high levels of cyclin-dependent kinase 6.** *Cancer Res* 1999, **59**(19):4984-4989.
33. Dittmer DP: **Transcription profile of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in primary Kaposi's sarcoma lesions as determined by real-time PCR arrays.** *Cancer Res* 2003, **63**(9):2010-2015.
34. Gandy SZ, Linnstaedt SD, Muralidhar S, Cashman KA, Rosenthal LJ, Casey JL: **RNA editing of the human herpesvirus 8 kaposin transcript eliminates its transforming activity and is induced during lytic replication.** *J Virol* 2007, **81**(24):13544-13551.
35. Lin CW, Tu PF, Hsiao NW, Chang CY, Wan L, Lin YT, Chang HW: **Identification of a novel septin 4 protein binding to human herpesvirus 8 kaposin A protein using a phage display cDNA library.** *J Virol Methods* 2007, **143**(1):65-72.
36. Cathomas G, Stalder A, Kurrer MO, Regamey N, Erb P, Joller-Jemelka HI: **Multiple myeloma and HHV8 infection.** *Blood* 1998, **91**(11):4391-4393.
37. Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ, Chang Y: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue.** *Nat Med* 1997, **3**(3):293-298.
38. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C: **Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(10):707-719.
39. Li M, MacKey J, Czajak SC, Desrosiers RC, Lackner AA, Jung JU: **Identification and characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K8.1 virion glycoprotein.** *J Virol* 1999, **73**(2):1341-1349.
40. Raab MS, Albrecht JC, Birkmann A, Yaguboglu S, Lang D, Fleckenstein B, Neipel F: **The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1.** *J Virol* 1998, **72**(8):6725-6731.
41. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M *et al*: **Identification of microRNAs of the herpesvirus family.** *Nat Methods* 2005, **2**(4):269-276.
42. Muralidhar S, Pumfery AM, Hassani M, Sadaie MR, Kishishita M, Brady JN, Doniger J, Medveczky P, Rosenthal LJ: **Identification of kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene.** *J Virol* 1998, **72**(6):4980-4988.
43. Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, Copas A, Boshoff C, Hatzioannou T, Suggett FE, Aldam DM, Denton AS *et al*: **Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma.** *Lancet* 1995, **346**(8978):799-802.
44. Boshoff C, Weiss RA: **Epidemiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001, **356**(1408):517-534.
45. Schulz TF: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8).** *J Gen Virol* 1998, **79** (Pt 7):1573-1591.
46. Di Alberti L, Ngui SL, Porter SR, Speight PM, Scully CM, Zakrewska JM, Williams IG, Artese L, Piattelli A, Teo CG: **Presence of human herpesvirus 8 variants in the oral tissues of human immunodeficiency virus-infected persons.** *J Infect Dis* 1997, **175**(3):703-707.
47. Monini P, Rotola A, de Lellis L, Corallini A, Secchiero P, Albin A, Benelli R, Parravicini C, Barbanti-Brodano G, Cassai E: **Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis.** *Int J Cancer* 1996, **66**(6):717-722.

48. LaDuca JR, Love JL, Abbott LZ, Dube S, Freidman-Kien AE, Poiesz BJ: **Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids.** *J Infect Dis* 1998, **178**(6):1610-1615.
49. Dukers NH, Rezza G: **Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and do not know.** *Aids* 2003, **17**(12):1717-1730.
50. Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G: **Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**(5):395-397.
51. Vitale F, Briffa DV, Whitby D, Maida I, Grochowska A, Levin A, Romano N, Goedert JJ: **Kaposi's sarcoma herpes virus and Kaposi's sarcoma in the elderly populations of 3 Mediterranean islands.** *Int J Cancer* 2001, **91**(4):588-591.
52. Gambus G, Bourboulia D, Esteve A, Lahoz R, Rodriguez C, Bolao F, Sirera G, Muga R, del Romero J, Boshoff C *et al*: **Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain.** *Aids* 2001, **15**(9):1167-1174.
53. Cattani P, Cerimele F, Porta D, Graffeo R, Ranno S, Marchetti S, Ricci R, Capodicasa N, Fuga L, Amico R *et al*: **Age-specific seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Mediterranean regions.** *Clin Microbiol Infect* 2003, **9**(4):274-279.
54. Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F: **Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype.** *J Infect Dis* 2000, **181**(5):1562-1568.
55. Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, Kron M, Ebbesen P, Biggar RJ: **Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations.** *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 1):155-163.
56. Sitas F, Pacella-Norman R, Carrara H, Patel M, Ruff P, Sur R, Jentsch U, Hale M, Rowji P, Saffer D *et al*: **The spectrum of HIV-1 related cancers in South Africa.** *Int J Cancer* 2000, **88**(3):489-492.
57. Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH: **Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection.** *N Engl J Med* 1998, **338**(14):948-954.
58. Bourboulia D, Whitby D, Boshoff C, Newton R, Beral V, Carrara H, Lane A, Sitas F: **Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection.** *Jama* 1998, **280**(1):31-32.
59. Brayfield BP, Phiri S, Kankasa C, Muyanga J, Mantina H, Kwenda G, West JT, Bhat G, Marx DB, Klaskala W *et al*: **Postnatal human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 infection in mothers and infants from Zambia.** *J Infect Dis* 2003, **187**(4):559-568.
60. Manji KP, Amir H, Maduhu IZ: **Aggressive Kaposi's sarcoma in a 6-month-old African infant: case report and review of the literature.** *Trop Med Int Health* 2000, **5**(2):85-87.
61. Plancoulaine S, Abel L, van Beveren M, Tregouet DA, Joubert M, Tortevoeye P, de The G, Gessain A: **Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population.** *Lancet* 2000, **356**(9235):1062-1065.
62. Schulz TF: **Epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8.** *Adv Cancer Res* 1999, **76**:121-160.
63. Kasolo FC, Mpabalwani E, Gompels UA: **Infection with AIDS-related herpesviruses in human immunodeficiency virus-negative infants and endemic childhood Kaposi's sarcoma in Africa.** *J Gen Virol* 1997, **78** (Pt 4):847-855.

64. Mizuta K, Oshitani H, Saijo M, Mpabalwani EM, Kasolo FC, Luo NP, Suzuki H, Numazaki Y: **Epidemiology of influenza virus infections in children with acute respiratory infections in Zambia.** *Ann Trop Paediatr* 1997, **17**(2):115-119.
65. Shimizu S, Katano H, Sata T, Chen KR, Tagami H, Hanabusa H, Shimizu H: **Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with advanced HIV infection.** *Arch Dermatol Res* 2001, **293**(7):380-381.
66. Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, Klein RS, Schuman P, Rich JD, Vlahov D, Pellett PE: **Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection.** *N Engl J Med* 2001, **344**(9):637-643.
67. Cannon MJ, Laney AS, Pellett PE: **Human herpesvirus 8: current issues.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**(1):82-87.
68. Mendez JC, Paya CV: **Kaposi's Sarcoma and Transplantation.** *Herpes* 2000, **7**(1):18-23.
69. Luppi M, Barozzi P, Santagostino G, Trovato R, Schulz TF, Marasca R, Bottalico D, Bignardi L, Torelli G: **Molecular evidence of organ-related transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus or human herpesvirus-8 in transplant patients.** *Blood* 2000, **96**(9):3279-3281.
70. Luppi M, Barozzi P, Guaraldi G, Ravazzini L, Rasini V, Spano C, Riva G, Vallerini D, Pinna AD, Torelli G: **Human herpesvirus 8-associated diseases in solid-organ transplantation: importance of viral transmission from the donor.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**(4):606-607; author reply 607.
71. Cassar O, Afonso PV, Bassot S, Plancoulaine S, Duprez R, Capuano C, Abel M, Martin PM, Gessain A: **Novel human herpesvirus 8 subtype D strains in Vanuatu, Melanesia.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(11):1745-1748.
72. Kosa C, Bodrogi T, Kaposi T: **The utilization of tissue adhesives in lymphovenous anastomoses.** *Polim Med* 1974, **4**(4):349-352.
73. Kaposi M, Fox GH, Johnston JC: **Pathology and treatment of diseases of the skin, for practitioners and students.** New York,: W. Wood & company; 1895.
74. Nidimusili AJ, Eisa N, Shaheen K: **Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma Presenting as Ileocolic Intussusception.** *N Am J Med Sci* 2013, **5**(11):666-668.
75. Sturzl M, Blasig C, Schreier A, Neipel F, Hohenadl C, Cornali E, Ascherl G, Esser S, Brockmeyer NH, Ekman M *et al*: **Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma.** *Int J Cancer* 1997, **72**(1):68-71.
76. Massambu C, Pyakurel P, Kaaya E, Enbom M, Urassa W, Demirhan I, Loewer J, Linde A, Chandra A, Heiden T *et al*: **Serum HHV8 DNA and Tat antibodies in Kaposi's sarcoma patients with and without HIV-1 infection.** *Anticancer Res* 2003, **23**(3B):2389-2395.
77. Enbom M, Urassa W, Massambu C, Thorstensson R, Mhalu F, Linde A: **Detection of human herpesvirus 8 DNA in serum from blood donors with HHV-8 antibodies indicates possible bloodborne virus transmission.** *J Med Virol* 2002, **68**(2):264-267.
78. Lamchahab FE, Tadlaoui I, Beqqal K, Bouattar T, Ouzeddoun N, Bayahia R, Ait Ourhroui M, Senouci K, Hassam B, Ismaili N: **[Iatrogenic Kaposi's disease in Morocco in a non-transplant context].** *Ann Dermatol Venereol* 2011, **138**(11):729-735.
79. Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW: **Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection?** *Lancet* 1990, **335**(8682):123-128.
80. Jenner RG, Boshoff C: **The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1602**(1):1-22.

81. Walts AE, Shintaku IP, Said JW: **Diagnosis of malignant lymphoma in effusions from patients with AIDS by gene rearrangement.** *Am J Clin Pathol* 1990, **94**(2):170-175.
82. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas.** *N Engl J Med* 1995, **332**(18):1186-1191.
83. Biberfeld P, Ensoli B, Sturzl M, Schulz TF: **Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8, cytokines, growth factors and HIV in pathogenesis of Kaposi's sarcoma.** *Curr Opin Infect Dis* 1998, **11**(2):97-105.
84. Brimo F, Michel RP, Khetani K, Auger M: **Primary effusion lymphoma: a series of 4 cases and review of the literature with emphasis on cytomorphologic and immunocytochemical differential diagnosis.** *Cancer* 2007, **111**(4):224-233.
85. Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, Dawson DB, Ansari MQ, Sald J, Knowles DM: **Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus.** *Blood* 1996, **88**(2):645-656.
86. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF: **HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses.** *Blood* 2009, **113**(6):1213-1224.
87. Drexler HG, Uphoff CC, Gaidano G, Carbone A: **Lymphoma cell lines: in vitro models for the study of HHV-8+ primary effusion lymphomas (body cavity-based lymphomas).** *Leukemia* 1998, **12**(10):1507-1517.
88. Drexler HG, Meyer C, Gaidano G, Carbone A: **Constitutive cytokine production by primary effusion (body cavity-based) lymphoma-derived cell lines.** *Leukemia* 1999, **13**(4):634-640.
89. Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT: **Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan.** *Jama* 1984, **251**(17):2255-2261.
90. Papac RJ: **Origins of cancer therapy.** *Yale J Biol Med* 2001, **74**(6):391-398.
91. Gilman A: **The initial clinical trial of nitrogen mustard.** *Am J Surg* 1963, **105**:574-578.
92. Meyer LM, Miller FR, Rowen MJ, Bock G, Rutzky J: **Treatment of acute leukemia with amethopterin (4-amino, 10-methyl pteroyl glutamic acid).** *Acta Haematol* 1950, **4**(3):157-167.
93. Li MC, Hertz R, Bergenstal DM: **Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists.** *N Engl J Med* 1958, **259**(2):66-74.
94. Yarris JP, Hunter AJ: **Roy Hertz, M.D. (1909-2002): the cure of choriocarcinoma and its impact on the development of chemotherapy for cancer.** *Gynecol Oncol* 2003, **89**(2):193-198.
95. Leucutia T: **Chemotherapy use in combination with irradiation for the treatment of cancer.** *Wis Med J* 1954, **53**(2):148-151.
96. Garcia-Manero G, Kantarjian HM: **The hyper-CVAD regimen in adult acute lymphocytic leukemia.** *Hematol Oncol Clin North Am* 2000, **14**(6):1381-1396, x-xi.
97. Gospodarowicz MK, Meyer RM: **The management of patients with limited-stage classical Hodgkin lymphoma.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:253-258.
98. Coiffier B: **Treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a look over the past decade.** *Clin Lymphoma Myeloma* 2006, **7 Suppl 1**:S7-13.

99. Nabholz JM, Cantin J, Chang J, Guevin R, Patel R, Tkaczuk K, Vodvarka P, Lindsay MA, Reese D, Riva A *et al*: **Phase III trial comparing granulocyte colony-stimulating factor to leridistim in the prevention of neutropenic complications in breast cancer patients treated with docetaxel/doxorubicin/cyclophosphamide: results of the BCIRG 004 trial.** *Clin Breast Cancer* 2002, **3**(4):268-275.
100. Bowman LC, Hancock ML, Santana VM, Hayes FA, Kun L, Parham DM, Furman WL, Rao BN, Green AA, Crist WM: **Impact of intensified therapy on clinical outcome in infants and children with neuroblastoma: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1988.** *J Clin Oncol* 1991, **9**(9):1599-1608.
101. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H: **Ewing's sarcoma family of tumors: current management.** *Oncologist* 2006, **11**(5):503-519.
102. Muggia FM, Green MD: **New anthracycline antitumor antibiotics.** *Crit Rev Oncol Hematol* 1991, **11**(1):43-64.
103. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: **Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity.** *Pharmacol Rev* 2004, **56**(2):185-229.
104. Fox M, Roberts JJ: **Drug resistance and DNA repair.** *Cancer Metastasis Rev* 1987, **6**(3):261-281.
105. Pommier Y: **Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(10):789-802.
106. Malinge JM, Giraud-Panis MJ, Leng M: **Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA.** *J Inorg Biochem* 1999, **77**(1-2):23-29.
107. Colvin OM: **An overview of cyclophosphamide development and clinical applications.** *Curr Pharm Des* 1999, **5**(8):555-560.
108. Robak T, Korycka A, Kasznicki M, Wrzesien-Kus A, Smolewski P: **Purine nucleoside analogues for the treatment of hematological malignancies: pharmacology and clinical applications.** *Curr Cancer Drug Targets* 2005, **5**(6):421-444.
109. Sigmond J, Peters GJ: **Pyrimidine and purine analogues, effects on cell cycle regulation and the role of cell cycle inhibitors to enhance their cytotoxicity.** *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2005, **24**(10-12):1997-2022.
110. Dorr RT: **Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics.** *Semin Oncol* 1992, **19**(2 Suppl 5):3-8.
111. Chen J, Stubbe J: **Bleomycins: towards better therapeutics.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(2):102-112.
112. Yarbro JW: **Mechanism of action of hydroxyurea.** *Semin Oncol* 1992, **19**(3 Suppl 9):1-10.
113. Brown SC, Shafer RH: **Kinetic studies of actinomycin D binding to mono-, oligo-, and polynucleotides.** *Biochemistry* 1987, **26**(1):277-282.
114. Bailey SA, Graves DE, Rill R: **Binding of actinomycin D to the T(G)nT motif of double-stranded DNA: determination of the guanine requirement in nonclassical, non-GpC binding sites.** *Biochemistry* 1994, **33**(38):11493-11500.
115. Koba M, Konopa J: **[Actinomycin D and its mechanisms of action].** *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005, **59**:290-298.
116. Zhou XJ, Rahmani R: **Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids.** *Drugs* 1992, **44 Suppl 4**:1-16; discussion 66-19.
117. Blagosklonny MV, Fojo T: **Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review).** *Int J Cancer* 1999, **83**(2):151-156.

118. Longo-Sorbello GS, Bertino JR: **Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials.** *Haematologica* 2001, **86**(2):121-127.
119. Pagliardi GL, Gabutti V, Gavosto F: **Mechanism of action of L-asparaginase on the cell cycle and growth in acute lymphoblastic leukemia.** *Acta Haematol* 1973, **50**(5):257-268.
120. Goy A, Gilles F: **Update on the proteasome inhibitor bortezomib in hematologic malignancies.** *Clin Lymphoma* 2004, **4**(4):230-237.
121. Camplejohn RS: **A critical review of the use of vincristine (VCR) as a tumour cell synchronizing agent in cancer therapy.** *Cell Tissue Kinet* 1980, **13**(3):327-335.
122. Rello-Varona S, Gamez A, Moreno V, Stockert JC, Cristobal J, Pacheco M, Canete M, Juarranz A, Villanueva A: **Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells.** *Int J Biochem Cell Biol* 2006, **38**(12):2183-2195.
123. Noguchi S: **Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers.** *Cancer Sci* 2006, **97**(9):813-820.
124. McGinn CJ, Kinsella TJ: **The experimental and clinical rationale for the use of S-phase-specific radiosensitizers to overcome tumor cell repopulation.** *Semin Oncol* 1992, **19**(4 Suppl 11):21-28.
125. Tafuri A, Lemoli RM, Chen R, Gulati SC, Clarkson BD, Andreeff M: **Combination of hematopoietic growth factors containing IL-3 induce acute myeloid leukemia cell sensitization to cycle specific and cycle non-specific drugs.** *Leukemia* 1994, **8**(5):749-757.
126. Colly LP, van Bekkum DW, Hagenbeek A: **Cell kinetic studies after high dose Ara-C and adriamycin treatment in a slowly growing rat leukemia model (BNML) for human acute myelocytic leukemia.** *Leuk Res* 1984, **8**(6):945-952.
127. Arany I, Safirstein RL: **Cisplatin nephrotoxicity.** *Semin Nephrol* 2003, **23**(5):460-464.
128. Shanholtz C: **Acute life-threatening toxicity of cancer treatment.** *Crit Care Clin* 2001, **17**(3):483-502.
129. Bardi E, Olah AV, Bartyik K, Endreffy E, Jenei C, Kappelmayer J, Kiss C: **Late effects on renal glomerular and tubular function in childhood cancer survivors.** *Pediatr Blood Cancer* 2004, **43**(6):668-673.
130. Schuler D, Kardos G, Koos R, Polcz A, Gacs G, Revesz T: **Late effects of therapy in children previously treated for leukaemia or malignant tumour.** *Acta Paediatr Hung* 1983, **24**(3):255-261.
131. Sargent JM: **The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples.** *Recent Results Cancer Res* 2003, **161**:13-25.
132. Bellamy WT: **Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays.** *Drugs* 1992, **44**(5):690-708.
133. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4**(4):406-425.
134. Kimura M: **A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.** *J Mol Evol* 1980, **16**(2):111-120.
135. Felsenstein J: **Estimating effective population size from samples of sequences: a bootstrap Monte Carlo integration method.** *Genet Res* 1992, **60**(3):209-220.
136. Felsenstein J: **A view of population genetics.** *Science* 1980, **208**(4449):1253.
137. Felsenstein J: **Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.** *J Mol Evol* 1981, **17**(6):368-376.

138. Cesarman E, Moore PS, Rao PH, Inghirami G, Knowles DM, Chang Y: **In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences.** *Blood* 1995, **86**(7):2708-2714.
139. Arvanitakis L, Mesri EA, Nador RG, Said JW, Asch AS, Knowles DM, Cesarman E: **Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus.** *Blood* 1996, **88**(7):2648-2654.
140. Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, Ganem D: **Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture.** *Nat Med* 1996, **2**(3):342-346.
141. Boshoff C, Gao SJ, Healy LE, Matthews S, Thomas AJ, Coignet L, Warnke RA, Strauchen JA, Matutes E, Kamel OW *et al*: **Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice.** *Blood* 1998, **91**(5):1671-1679.
142. Carbone A, Cilia AM, Gloghini A, Capello D, Todesco M, Quattrone S, Volpe R, Gaidano G: **Establishment and characterization of EBV-positive and EBV-negative primary effusion lymphoma cell lines harbouring human herpesvirus type-8.** *Br J Haematol* 1998, **102**(4):1081-1089.
143. Trivedi P, Takazawa K, Zompetta C, Cuomo L, Anastasiadou E, Carbone A, Uccini S, Belardelli F, Takada K, Frati L *et al*: **Infection of HHV-8+ primary effusion lymphoma cells with a recombinant Epstein-Barr virus leads to restricted EBV latency, altered phenotype, and increased tumorigenicity without affecting TCL1 expression.** *Blood* 2004, **103**(1):313-316.
144. Gaidano G, Cechova K, Chang Y, Moore PS, Knowles DM, Dalla-Favera R: **Establishment of AIDS-related lymphoma cell lines from lymphomatous effusions.** *Leukemia* 1996, **10**(7):1237-1240.
145. Cannon JS, Ciuffo D, Hawkins AL, Griffin CA, Borowitz MJ, Hayward GS, Ambinder RF: **A new primary effusion lymphoma-derived cell line yields a highly infectious Kaposi's sarcoma herpesvirus-containing supernatant.** *J Virol* 2000, **74**(21):10187-10193.
146. Crews KR, Liu T, Rodriguez-Galindo C, Tan M, Meyer WH, Panetta JC, Link MP, Daw NC: **High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma.** *Cancer* 2004, **100**(8):1724-1733.
147. Albertioni F, Lindemalm S, Reichelova V, Pettersson B, Eriksson S, Juliusson G, Liliemark J: **Pharmacokinetics of cladribine in plasma and its 5'-monophosphate and 5'-triphosphate in leukemic cells of patients with chronic lymphocytic leukemia.** *Clin Cancer Res* 1998, **4**(3):653-658.
148. Hersh MR, Kuhn JG, Phillips JL, Clark G, Ludden TM, Von Hoff DD: **Pharmacokinetic study of fludarabine phosphate (NSC 312887).** *Cancer Chemother Pharmacol* 1986, **17**(3):277-280.
149. Chan GL, Erdmann GR, Gruber SA, Stock P, Chen S, Ascher NL, Canafax DM: **Pharmacokinetics of 6-thiouric acid and 6-mercaptopurine in renal allograft recipients after oral administration of azathioprine.** *Eur J Clin Pharmacol* 1989, **36**(3):265-271.
150. Gruber A, Liliemark E, Tidefelt U, Paul C, Bjorkholm M, Peterson C, Liliemark J: **Pharmacokinetics of mitoxantrone, etoposide and cytosine arabinoside in leukemic cells during treatment of acute myelogenous leukemia--relationship to treatment outcome and bone marrow toxicity.** *Leuk Res* 1995, **19**(10):757-761.

151. Casale F, Canaparo R, Serpe L, Muntoni E, Pepa CD, Costa M, Mairone L, Zara GP, Fornari G, Eandi M: **Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients.** *Pharmacol Res* 2004, **50**(2):173-179.
152. Fogli S, Danesi R, Gennari A, Donati S, Conte PF, Del Tacca M: **Gemcitabine, epirubicin and paclitaxel: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions in advanced breast cancer.** *Ann Oncol* 2002, **13**(6):919-927.
153. Alberts DS, Chang SY, Chen HS, Larcom BJ, Evans TL: **Comparative pharmacokinetics of chlorambucil and melphalan in man.** *Recent Results Cancer Res* 1980, **74**:124-131.
154. Ghazal-Aswad S, Hogarth L, Hall AG, George M, Sinha DP, Lind M, Calvert AH, Sunter JP, Newell DR: **The relationship between tumour glutathione concentration, glutathione S-transferase isoenzyme expression and response to single agent carboplatin in epithelial ovarian cancer patients.** *Br J Cancer* 1996, **74**(3):468-473.
155. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E: **Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(4):1205-1218.
156. Rischin D, Ackland SP, Smith J, Garg MB, Clarke S, Millward MJ, Toner GC, Zalcborg J: **Phase I and pharmacokinetic study of docetaxel in combination with epirubicin and cyclophosphamide in advanced cancer: dose escalation possible with granulocyte colony-stimulating factor, but not with prophylactic antibiotics.** *Ann Oncol* 2002, **13**(11):1810-1818.
157. Bates SE, Bakke S, Kang M, Robey RW, Zhai S, Thambi P, Chen CC, Patil S, Smith T, Steinberg SM *et al*: **A phase I/II study of infusional vinblastine with the P-glycoprotein antagonist valspodar (PSC 833) in renal cell carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(14):4724-4733.
158. Desai ZR, Van den Berg HW, Bridges JM, Shanks RG: **Can severe vincristine neurotoxicity be prevented?** *Cancer Chemother Pharmacol* 1982, **8**(2):211-214.
159. Freyer G, Delozier T, Lichinister M, Gedouin D, Bournoux P, His P, Imadalou K, Trillet-Lenoir V: **Phase II study of oral vinorelbine in first-line advanced breast cancer chemotherapy.** *J Clin Oncol* 2003, **21**(1):35-40.
160. Andersson B, Andersson I, Beran M, Ehrsson H, Eksborg S: **Liquid chromatographic monitoring of daunorubicin and daunorubicinol in plasma from leukemic patients treated with daunorubicin or the daunorubicin-DNA complex.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1979, **2**(1):15-17.
161. Toffoli G, Corona G, Cattarossi G, Boiocchi M, Di Gennaro G, Tirelli U, Vaccher E: **Effect of highly active antiretroviral therapy (HAART) on pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma.** *Ann Oncol* 2004, **15**(12):1805-1809.
162. Veal GJ, Cole M, Errington J, Parry A, Hale J, Pearson AD, Howe K, Chisholm JC, Beane C, Brennan B *et al*: **Pharmacokinetics of dactinomycin in a pediatric patient population: a United Kingdom Children's Cancer Study Group Study.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(16):5893-5899.
163. Peng YM, Alberts DS, Chen HS, Mason N, Moon TE: **Antitumour activity and plasma kinetics of bleomycin by continuous and intermittent administration.** *Br J Cancer* 1980, **41**(4):644-647.
164. Kozuch P, Hoff PM, Hess K, Adams J, Newman RA, Lee F, Pazdur R: **Phase I bioequivalency study of MitoExtra and mitomycin C in patients with solid tumors.** *Cancer* 2001, **91**(4):815-821.

165. Yan JH, Ataga K, Kaul S, Olson JS, Grasela DM, Gothelf S, Kutlar A, Orringer E: **The influence of renal function on hydroxyurea pharmacokinetics in adults with sickle cell disease.** *J Clin Pharmacol* 2005, **45**(4):434-445.
166. Gerrits CJ, Schellens JH, Burris H, Eckardt JR, Planting AS, van der Burg ME, Rodriguez GI, Loos WJ, van Beurden V, Hudson I *et al*: **A comparison of clinical pharmacodynamics of different administration schedules of oral topotecan (Hycamtin).** *Clin Cancer Res* 1999, **5**(1):69-75.
167. Ylikangas P, Mononen I: **Serious neutropenia in ALL patients treated with L-asparaginase may be avoided by therapeutic monitoring of the enzyme activity in the circulation.** *Ther Drug Monit* 2002, **24**(4):502-506.
168. Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millikan RE, Tu SM, Pagliaro L *et al*: **Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(11):2108-2121.
169. Penzak SR, Formentini E, Alfaro RM, Long M, Natarajan V, Kovacs J: **Prednisolone pharmacokinetics in the presence and absence of ritonavir after oral prednisone administration to healthy volunteers.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **40**(5):573-580.
170. Cook PM, Whitby D, Calabro ML, Luppi M, Kakoola DN, Hjalgrim H, Ariyoshi K, Ensoli B, Davison AJ, Schulz TF: **Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. International Collaborative Group.** *Aids* 1999, **13**(10):1165-1176.
171. Lo YM, Mehal WZ, Fleming KA: **In vitro amplification of hepatitis B virus sequences from liver tumour DNA and from paraffin wax embedded tissues using the polymerase chain reaction.** *J Clin Pathol* 1989, **42**(8):840-846.
172. Higgins DG, Sharp PM: **Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer.** *Comput Appl Biosci* 1989, **5**(2):151-153.
173. Felsenstein J: **Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability.** *Annu Rev Genet* 1988, **22**:521-565.
174. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S: **Open source clustering software.** *Bioinformatics* 2004, **20**(9):1453-1454.
175. Nagy K, Horvath A, Medveczky M, Szabo Z, Toth A, Szende B, Yangco BG, Medveczky P: **Human Herpesvirus 8 DNA in Visceral Kaposi's Sarcoma of AIDS and Other Immunocompromised Patients in Hungary.** *Cancer Control* 1997, **4**(1):60-64.
176. Moore PS, Chang Y: **Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection.** *N Engl J Med* 1995, **332**(18):1181-1185.
177. Moore PS, Kingsley LA, Holmberg SD, Spira T, Gupta P, Hoover DR, Parry JP, Conley LJ, Jaffe HW, Chang Y: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma.** *Aids* 1996, **10**(2):175-180.
178. Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D: **The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission.** *Nat Med* 1996, **2**(8):918-924.
179. Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P *et al*: **Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen.** *Lancet* 1996, **348**(9035):1133-1138.

180. Polstra AM, Van Den Burg R, Goudsmit J, Cornelissen M: **Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(12):5488-5491.
181. Gao SJ, Zhang YJ, Deng JH, Rabkin CS, Flore O, Jenson HB: **Molecular polymorphism of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human herpesvirus 8) latent nuclear antigen: evidence for a large repertoire of viral genotypes and dual infection with different viral genotypes.** *J Infect Dis* 1999, **180**(5):1466-1476.
182. Beyari MM, Hodgson TA, Cook RD, Kondowe W, Molyneux EM, Scully CM, Teo CG, Porter SR: **Multiple human herpesvirus-8 infection.** *J Infect Dis* 2003, **188**(5):678-689.
183. Cook RD, Hodgson TA, Waugh AC, Molyneux EM, Borgstein E, Sherry A, Teo CG, Porter SR: **Mixed patterns of transmission of human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Malawian families.** *J Gen Virol* 2002, **83**(Pt 7):1613-1619.
184. Zong JC, Metroka C, Reitz MS, Nicholas J, Hayward GS: **Strain variability among Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by a single common isolate.** *J Virol* 1997, **71**(3):2505-2511.
185. Meng YX, Sata T, Stamey FR, Voevodin A, Katano H, Koizumi H, Deleon M, De Cristofano MA, Galimberti R, Pellett PE: **Molecular characterization of strains of Human herpesvirus 8 from Japan, Argentina and Kuwait.** *J Gen Virol* 2001, **82**(Pt 3):499-506.
186. Szalai E, Takacs M, Otvos R, Szlavik J, Juhasz A, Berencsi G: **Genotypic distribution of human herpesvirus-8 strains circulating in HIV-positive patients with and without Kaposi's sarcoma in Hungary.** *Arch Virol* 2005, **150**(7):1315-1326.
187. Zhang D, Pu X, Wu W, Jin Y, Juhear M, Wu X: **Genotypic analysis on the ORF-K1 gene of human herpesvirus 8 from patients with Kaposi's sarcoma in Xinjiang, China.** *J Genet Genomics* 2008, **35**(11):657-663.
188. Lacoste V, Kadyrova E, Chistiakova I, Gurtsevitch V, Judde JG, Gessain A: **Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia.** *J Gen Virol* 2000, **81**(Pt 5):1217-1222.
189. Zavos G, Gazouli M, Papaconstantinou I, Lukas JC, Zografidis A, Kostakis A, Nasioulas G: **Prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequences in human immunodeficiency virus-negative individuals without Kaposi's sarcoma in Greece.** *In Vivo* 2005, **19**(4):729-732.
190. Azadmanesh K, Norouzfard ZS, Sohrabi A, Safaie-Naraghi Z, Moradi A, Yaghmaei P, Naraghi MM, Arashkia A, Eslamifar A: **Characterization of human herpes virus 8 genotypes in Kaposi's sarcoma patients in Tehran, Iran.** *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012, **3**(2):144-152.
191. Kajumbula H, Wallace RG, Zong JC, Hokello J, Sussman N, Simms S, Rockwell RF, Pozos R, Hayward GS, Boto W: **Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes.** *Intervirology* 2006, **49**(3):133-143.
192. White T, Hagen M, Gudza I, White IE, Ndemera B, Gwanzura L, Borok M, Campbell TB: **Genetic diversity of the Kaposi's sarcoma herpesvirus K1 protein in AIDS-KS in Zimbabwe.** *J Clin Virol* 2008, **42**(2):165-171.
193. Cassar O, Charavay F, Bassot S, Plancoulaine S, Grangeon JP, Laumond-Barny S, Martin PM, Chanteau S, Gessain A: **Divergent KSHV/HHV-8 subtype D strains in New Caledonia and Solomon Islands, Melanesia.** *J Clin Virol* 2012, **53**(3):214-218.

194. Cassar O, Blondot ML, Mohanna S, Jouvion G, Bravo F, Maco V, Duprez R, Huerre M, Gotuzzo E, Gessain A: **Human herpesvirus 8 genotype E in patients with Kaposi sarcoma, Peru.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**(9):1459-1462.
195. Kazanji M, Dussart P, Duprez R, Tortevoeye P, Pouliquen JF, Vandekerkhove J, Couppie P, Morvan J, Talarmin A, Gessain A: **Serological and molecular evidence that human herpesvirus 8 is endemic among Amerindians in French Guiana.** *J Infect Dis* 2005, **192**(9):1525-1529.
196. Gazouli M, Papaconstantinou I, Zavos G, Metaxa-Mariatou V, Nasioulas G, Boletis J, Arapadoni-Dadioti P, Giaslakitiotis K, Zografidis A, Kostakis A: **Human herpesvirus type 8 genotypes in iatrogenic, classic and AIDS-associated Kaposi's sarcoma from Greece.** *Anticancer Res* 2004, **24**(3a):1597-1602.

9. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

Kaposi sarcoma/Kaposi sarcoma

HHV-8/HHV-8

Testüregi B-sejtes lymphoma/Body-cavity based lymphoma

Gyógyszerérzékenységi teszt/Drug sensitivity assay

PCR/PCR

HHV-8 törzsek/HHV-8 strains

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kónya József egyetemi docensnek, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet vezetőjének, aki hozzáértő szakmai segítségével munkámat lelkiismeretesen irányította. Köszönöm a Karolinska Intézet professzorának Dr. Székely Lászlónak és Skribek Henriettének, akik a stockholmi munkám közvetlen irányítójaként segítettek és bevezettek a kutatómunka izgalmas világába. Mindhárman nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a munkaterv, a kéziratok és a PhD. dolgozat megszületésében.

Köszönetet szeretnék mondani Gergely Lajos Professzor Úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet korábbi vezetőjének, aki lehetővé tette, hogy az intézet keretei között végezhessem PhD tanulmányaimat.

Hálás köszönettel tartozom Balla György Professzor Úrnak segítő észrevételeiért és a folyamatos támogatásáért.

Továbbá köszönetet mondok szerzőtársaimnak, különösen Dr. Márkász Lászlónak, Emilie Flabergnek, Ujvári Dorinának, akik támogattak a kutatómunkámban.

Kutatásaim végzéséhez elengedhetetlen technikai segítséget nyújtott Szécsiné Kerekes Margit, Ródéné Ötvös Zita, Dr. Salamon Dániel és Muhari Orsolya akiknek ezúton is szeretnék köszönetet mondani.

Végül köszönöm férjemnek, édesanyámnak, családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és támogattak a munkám során.

FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/53/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Ötvös Rita
Neptun kód: VEEKST
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

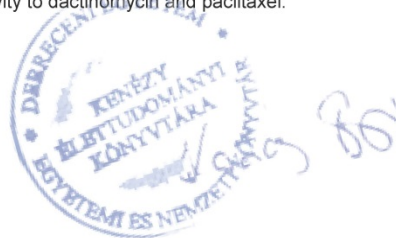
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ötvös, R.**, Juhász, A., Szalai, E., Újvári, D., Ötvös, K., Szabó, K., Remenyik, É., Székely, L., Gergely, L., Kónya, J.: Molecular Typing of Human Herpesvirus 8 Isolates from Patients with Kaposi's Sarcoma in Hungary.
Anticancer Res. 34 (2), 893-898, 2014.
IF:1.713 (2012)
2. **Ötvös, R.**, Skribek, H., Kis, L.L., Glohini, A., Márkász, L., Flaberg, E., Eksborg, S., Kónya, J., Gergely, L., Carbone, A., Székely, L.: Drug sensitivity patterns of HHV8 carrying body cavity lymphoma cell lines.
BMC Cancer. 11, 441, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-11-441>
IF:3.011



További Közlemények

3. Skribek, H., **Ötvös, R.**, Flaberg, E., Nagy, N., Márkász, L., Eksborg, S., Masszi, T., Kozma, A., Ádám, E., Miseta, A., Klein, É., Székely, L.: Chronic lymphoid leukemia cells are highly sensitive to the combination of prednisolone and daunorubicin, but much less to doxorubicin or epirubicin.
Exp. Hematol. 38 (12), 1219-1230, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2010.09.001>
IF:3.198
4. Márkász, L., Vanherberghen, B., Flaberg, E., **Ötvös, R.**, Stuber, G., Gustafsson Jernberg, Å., Oláh, É., Skribek, H., Székely, L.: NK cell-mediated lysis is essential to kill Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B cells when using rituximab.
Biomed. Pharmacother. 63 (6), 413-420, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2008.08.009>
IF:2.238
5. Stuber, G., Flaberg, E., Petrányi, G., **Ötvös, R.**, Rökäeus, N., Kashuba, E., Wiman, K.G., Klein, G., Székely, L.: PRIMA-1MET induces nucleolar translocation of Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 protein.
Mol. Cancer. 8, Article ID: 23, 1-12, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-8-23>
IF:4.16
6. Márkász, L., Skribek, H., Uhlin, M., **Ötvös, R.**, Flaberg, E., Eksborg, S., Oláh, É., Stuber, G., Székely, L.: Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on cytotoxic activity of human cytotoxic T-lymphocytes.
J. Immunother. 31 (3), 283-293, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181628b76>
IF:3.662
7. Márkász, L., Kis, L.L., Stuber, G., Flaberg, E., **Ötvös, R.**, Eksborg, S., Skribek, H., Oláh, É., Székely, L.: Hodgkin-lymphoma-derived cells show high sensitivity to dactinomycin and paclitaxel.
Leuk. Lymphoma. 48 (9), 1835-1845, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10428190701559132>
IF:1.512



8. Szalai, E., Takács, M., **Ötvös, R.**, Szlávik, J., Juhász, A., Berencsi, G.: Genotypic distribution of human herpesvirus-8 strains circulating in HIV-positive patients with and without Kaposi's sarcoma in Hungary.
Arch. Virol. 150 (7), 1315-1326, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-005-0508-y>
IF:1.819

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21.313

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4.724

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.12

