

3. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Konaná 20. 5. 2002 pod záštitou děkana 1. LF
doc. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc.

3. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Konaná 20. 5. 2002 pod záštitou děkana 1. LF
doc. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc.

OBSAH

Slovo úvodem	3
Pozvánka	4
Seznam účastníků 3. studentské vědecké konference 1. lékařské fakulty	5
Hodnotitelské komise	6
Abstrakta prací účastníků 3. studentské vědecké konference podle umístění v sekcích	7
Sekce prací pregraduálních studentů - část teoretická	8
Sekce prací pregraduálních studentů - část klinická	13
Sekce přednesených prací v doktorském studijním programu	18
Sekce posterů v doktorském studijním programu	26
Vítězné práce 3. studentské vědecké konference - in extenso	33
Sekce prací pregraduálních studentů - část teoretická	34
Tereza Pelichovská - Successful engraftment of donor cells depends on time interval between cyclophosphamide and irradiation in experimental murine model of bone marrow transplantation	34
Jiří Šedý - Význam NT-3/trk C signalizace pro tvorbu Paciniho tělísek na bérce u myši	38
Václava Jeřábková, David Kemlink - Analýza morfologických fenotypů laboratorního potkana	43
Sekce prací pregraduálních studentů - část klinická	49
Jiří Klempíř - Huntingtonova nemoc: analýza vztahů mezi klinickými projevy, anamnestickými daty a výsledky pomocných vyšetřovacích metod (práce oceněna zvláštní cenou Zdravotnických novin)	49
Tereza Fuchsová - Diagnostický a terapeutický přístup k alergii na bílkovinu kravského mléka v dětském věku	54
Zdenka Vaňková - Paraneoplastické autoprotilátky - metodiky, první zkušenosti	59
Lenka Bošanská - Kouření, preventivní kardiologie a středoškoláci	65
Sekce přednesených prací v doktorském studijním programu	69
Martin Vejražka, Radan Míček - Dvojitý účinek apocyninu: inhibitor fagocytární NADPH oxidázy, stimulator produkce reaktivních forem kyslíku v nefagocytech	69
E. Maloňová, R. Rosipal, J. Zeman, P. Martásek - Mutation analysis in czech patients with porphyria variegata	75
Jaromíra Večeřová - Lamins A/C are not essential for speckle morphology	78

SLOVO ÚVODEM

Tradici fakultních studentských vědeckých konferencí jsme obnovili v roce 2000. Podle nového číslování je tedy letošní Fakultní Studentská vědecká konference 2002 třetí v pořadí. Tradice studentských konferencí je mnohem starší. Mnozí učitelé, kteří jsou na čelných místech fakulty v hodnocení vědy vítězili v 60., 70., či 80. letech ve fakultních a celostátních kolech studentských konferencí. To ukazuje, jak důležité je podchytit studenty k vědecké práci včas. Doufám tedy, že studenti, kteří letos prezentují své práce, nejen uspějí v celostátních kolech, ale budou svou účastí získání pro vědu a jednoho dne z nich budou významní učitelé naší fakulty. Studenti doktorského studia by měli vystupovat spíše na opravdových vědeckých konferencích. Přesto je významné, pokud si zejména v nižších ročnících zkusí vystoupení nanečisto na našem studentském fóru a porovnají svůj projev a výsledky s dalšími kolegy. Nejvíce nás pak těší pokud v posledních letech občas vidáme pregraduální studenty vystupovat na opravdových českých vědeckých sjezdech. Naše fakulta má velký vědecký potenciál, ale jistě platí: Čím více se nám bude dařit získávat studenty pro vědeckou práci, tím lepší budoucnost fakultu čeká.

Atmosféra studentských konferencí je desítky let stejná. Kontrastuje vysoká kvalita některých prací s nervozitou studentů, kteří vystupují často poprvé na veřejnosti a mají rychle zasvětit posluchače do problematiky, vysvětlit cíl své práce a uvést její výsledky.

Studentská vědecká konference rozhodně mezi fakultními akcemi není akcí opomíjenou. Hodnotící komise i letos vybraly řadu prací k ocenění. Rád bych jim touto cestou poděkoval za skvělou práci. Za precizní přípravu a organizační zajištění konference děkuji prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc., proděkanovi pro vědeckou práci a výzkum, vedoucí oddělení pro vědeckou práci a výzkum paní Jitce Buczkové, jejímu kolektivu oddělení vědy a paní Mgr. Vlastě Helekalové, vedoucí oddělení vnějších styků.

Přípravy příštího ročníku jsou zahájeny a doufám, že i pročtení tohoto sborníku přispěje k tomu, že další studenti získají odvalu na vědeckém fóru vystupovat.



doc. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
děkan fakulty

*3.ročník Studentské vědecké
konference na 1.LF slavnostně
zahájil děkan 1. lékařské fakulty
doc. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.*



3. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

1. lékařské fakulty
konaná pod záštitou děkana 1. LF
doc. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc.

20. KVĚTNA 2002

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

*3. studentskou vědeckou konferenci zahájí děkan 1. lékařské fakulty
doc. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc. dne 20. května 2002 v 8.00 hodin
v zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2.*

Studentská vědecká konference bude uspořádána ve dvou sekcích. Sekce postgraduálních prací a sekce pregraduálních prací, která je rozdělena na část teoretickou a preklinickou.

Sekce pregraduálních prací bude probíhat 20. května 2002, a to:

klinická část: od 8.15 hodin v posluchárně Stomatologické kliniky 1. LF, Kateřinská 32, Praha 2

teoretická část: od 13.00 hodin v posluchárně Stomatologické kliniky 1. LF, Kateřinská 32, Praha 2

Sekce postgraduálních prací bude probíhat 20. května 2002

od 8.15 hodin v zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2

Práce mohou být prezentovány v českém i anglickém jazyce.

Doba přednášky bude maximálně 10 minut a prostor pro diskusi 5 minut.

K dispozici bude dataprojektor, zpětný projektor a diaprojektor s možností dvojprojekce.

Účastníky konference žádáme, aby si přinesli svůj osobní notebook.

K pozvánce je přiložen časový harmonogram jednotlivých vystoupení.

prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.
proděkan pro vědeckou práci a výzkum

doc. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
děkan fakulty

Veškeré informace o konání 3. SVK:

Oddělení pro vědeckou činnost

a zahraniční styky 1. LF

Tatiana Králová, tel. 249 643 58

e-mail: tkral@lf1.cuni.cz

**Sekce prací pregraduálních studentů
- teoretická část**

- 1. Jandová Zuzana
- 2. Jeřábková V., Kemlink D.
- 3. Kalinčík Tomáš
- 4. Mejstříková Ester
- 5. Pelichovská Tereza
- 6. Poláček Hubert
- 7. Říha Pavel, Wittner Michal
- 8. Šedý Jiří
- 9. Zápotocký Michal

**Sekce prací pregraduálních studentů
- klinická část**

- 1. Bajerová Jana
- 2. Bošanská Lenka
- 3. Fuchsová Tereza
- 4. Hippmann Radek.
- 5. Klempíř Jiří
- 6. Knížková Jana
- 7. Mazánková Veronika
- 8. Nesnídal Petr
- 9. Stebel Jakub
- 10. Vaňková Zdenka

**Sekce prací
v doktorském studijním programu**

- 1. Canová Nikolína, MUDr.
- 2. Honzík Tomáš, MUDr.
- 3. Hořínek Daniel, MUDr.
- 4. Jiříčková Adriana, MUDr.
- 5. Kaminský Ondřej, Mgr.
- 6. Kasalová Zdislava, MUDr.
- 7. Kučera Tomáš, MUDr.
- 8. Maloňová Eva, MUDr.
- 9. Melechovský David, MUDr.
- 10. Ort Michael, MUDr., Ing.
- 11. Pařízková Jitka, MUDr.
- 12. Rosická Martina, MUDr.
- 13. Tesařová Markéta, Ing.
- 14. Týblová Michaela, MUDr.
- 15. Uhlíková Petra, MUDr.
- 16. Vaníčková Zdislava, MUDr.
- 17. Večeřová Jaromíra, Mgr.
- 18. Vejražka Martin, MUDr.
- 19. Vevera Jan, MUDr.
- 20. Zámečník Libor, MUDr.

Sekce posterů v doktorském studijním programu

- 1. Benešová Petra, MUDr.
- 2. Bob Petr, RNDr.,PhD.
- 3. Böhm Marek, MUDr.
- 4. Canová Nikolína, MUDr.
- 5. Fraško Roman, MUDr.
- 6. Kasalová Zdislava, MUDr.
- 7. Langrová Kateřina, MUDr.
- 8. Lišková Petra, MUDr.
- 9. Lojková Denisa, Mgr.
- 10. Pavlišta David, MUDr.
- 11. Rathous Ivo, MUDr.
- 12. Řasová Kamila, PhDr.
- 13. Stárková Lucie, MUDr.
- 14. Trča Stanislav, MUDr.
- 15. Valkounová Iveta, MUDr.

Hodnotitelské komise 3. studentské vědecké konference 1. LF konané dne 20. 5. 2002

Sekce pregraduálních studentů

klinická část

předseda: prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.
člen: doc. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

teoretická část

předseda: prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.
členové: RNDr. Jana Ledvinová, CSc.
doc. MUDr. Karel Smetana, DrSc.

Sekce postgraduálních studentů

předseda: prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
členové: doc. MUDr. František Perlík, CSc.
doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.

**ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ
3. STUDENTSKÉ VĚDECKÉ KONFERENCE
PODLE UMÍSTĚNÍ V SEKČÍCH**



1. místo**SUCCESSFUL ENGRAFTMENT OF DONOR CELLS DEPENDS ON TIME INTERVAL BETWEEN CYCLOPHOSPHAMIDE AND IRRADIATION IN EXPERIMENTAL MURINE MODEL OF BONE MARROW TRANSPLANTATION.**

Autoři: Tereza Pelichovská, Luděk Šefc

Školitel: RNDr. Luděk Šefc, CSc. - Ústav patologické fyziologie 1. LF

■ **Objective:** Cyclophosphamide is a commonly used chemotherapeutic drug in cancer chemotherapy and in immunosuppression. It is used, along with total body irradiation (TBI), as a conditioning regimen for patients indicated for hematopoietic stem cell transplantation. TBI is usually delivered starting one or two days after CY pretreatment. We have used a murine model to evaluate importance of proper timing between CY and TBI on effectivity of bone marrow engraftment.

■ **Materials and Methods:** C57B1/6 Ly5.2 and congenic Ly5.1 mice were used. Mice were pretreated with Cy (135 mg/kg) i.p., and after 2, 3, 5, 7, 10 or 14 days underwent 5 Gy of TBI. Control mice were irradiated only. Two hrs after TBI, mice were transplanted with $2 \cdot 10^6$ bone marrow cells. The chimerism (% of donor hematopoiesis) was repeatedly measured in individual mice up to 10 months after transplantation. The ratio of Ly5.1 and Ly5.2 mononuclear cells were determined in peripheral blood using Becton Dickinson FACScan cytometer.

■ **Results:** control mice without CY achieved stable chimerism approx. 30% of donor cells already 1 month after transplantation. CY administrated 2 days prior TBI led to significantly lower short-term engraftment of donor cells but after 3 months chimerism reached levels comparable to controls. On the other hand, if the interval between CY and TBI was prolonged to 5 or 7 days, the percentage of donor cells exceeded 80%. High efficiency of bone marrow depletion using the interval of 5 or 7 days between CY and TBI corresponded to previously obtained data showing higher depletion of recipient pluripotential hematopoietic progenitors (CFU-S) after such treatment.

■ **Conclusion:** the engraftment after bone marrow transplantation depends on proper timing between CY administration and TBI. Our data showed that longer period (5 or 7 days) between CY administration and TBI led to significantly higher engraftment compared to the interval of 2 days.

2. místo**VÝZNAM NT-3/TRK C SIGNALIZACE PRO TVORBU PACINIHO TĚLÍSEK NA BĚRCI U MYŠI**

Autor Jiří Šedý

Školitel: doc. MUDr. Miloš Grim, DrSc. - Anatomický ústav 1. LF

■ Vývoj mechanoreceptorů je podmíněn morfogenetickými interakcemi senzitivních nervů a cílových buněk v periférii. V těchto interakcích se uplatňují neurotrofiny a neureguliny. Cílem této studie je zjistit význam neurotrofinu NT-3 a jeho Trk C receptoru pro tvorbu Paciniho tělísek, která jsou jedním z opouzdřených, rychle se adaptujících mechanoreceptorů. Na membrana interossea cruris a přilehlé ploše distálního konce fibuly se konstantně vyskytuje skupina těchto tělísek. Jsou inervována z n. interosseus dorsalis a jejich počet je dobře stanovitelný.

Ke studiu byly použity novorozenci mutantních kmenů myši s inaktivovaným genem NT-3 (Tessarollo et al., 1997) a TrkC (Farinas et al. 1994). Byly analyzováni homozygoti, heterozygoti i wild type. Tělíska byla znázorňována po mikro-preparaci in situ průkazem acetylcholinesterázy (Karnovsky, Roots 1964) modifikovanou přidáním Tritonu X-100 do inkubačního media.

Stanovení počtu Paciniho tělísek ukázalo, že NT-3/ TrkC signalizace je jedním z faktorů, který se uplatňuje za jejich vývoje. U TrkC mutantních myši se Paciniho tělíska tvořila v menším počtu než u kontrolních zvířat a u NT-3 mutant byl jejich počet ještě nižší. Nebylo však zjištěno jejich úplné vymizení.

3. místo**ANALÝZA MORFOLOGICKÝCH FENOTYPŮ LABORATORNÍHO POTKANA**

Autoři: Václava Jeřábková, David Kemlink

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc. - Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF a VFN

■ Laboratorní potkan je již dlouho používán v biomedicínských oborech k výzkumu fyziologie a patofyziologie jako modelový organismus. Rekombinantní inbrední (RI) kmeny laboratorního potkana jsou užívány k mapování mendelovsky dědičných a kvantitativních znaků. Sada rekombinantních inbredních kmenů je fixovaná F2 populace vzniklá opakovaným křížením dvou vysoce inbredních progenitorních kmenů systémem bratr x sestra. Výsledkem je soubor

kmenů nesoucích různé kombinace genomů progenitorních kmenů v homozygotní formě, čímž je simulována populace s kontinuální distribucí kvantitativních znaků. Výhodou je zvýšení heritability komplexních genetických znaků a zvýšení vyhlídek na mapování vyvolávajících QTL (quantitative trait loci). RI kmeny se rovněž používají k odhalování interakcí genomu s prostředím. Genetický profil RI kmenů pak popisuje tzv. SDP (strain distribution pattern), který je souborem DNA markerů. SDP je základem pro vazebnou genetickou mapu RI kmenů a zároveň se používá pro asociační analýzu. Ta sestává z několika statistických metod porovnávajících SDP s fenotypem jednotlivých RI kmenů a odhaluje oblasti genomu, které odpovídají za rozdíly mezi RI kmeny v zadaném fenotypu a obsahovat modifikující geny. V této práci byl studován potkaní model poruchy vývoje končetin - syndrom polydaktylie-luxace (PLS). Asociační studie byly provedeny s výsledky digitální morfometrické analýzy parametrů zadních končetin po podání kyseliny retinové (RA).

BEZ OCENĚNÍ:

LOKALIZACE CD36 INZERTU V TRANSGENNÍ LINII VAZEBNOU ANALÝZOU

Autor: Zuzana Jandová

Školitel: prof. MUDr. V. Křen, DrSc., MUDr. F. Liška - Ústav biologie a genetiky 1. LF a VFN

■ Spontánně hypertenzní kmen laboratorního potkana (SHR) je modelem lidské esenciální hypertenze s defekty v metabolismu glukózy a mastných kyselin. U tohoto kmene byla prokázána mutace v genu *Cd36/Fat-fatty acid translocase*, který funguje jako ligand pro mnoho dalších molekul účinkujících v rozličných fyziologických a patologických procesech.

Defekty SHR kmene byly částečně zlepšeny po jeho transgenezi konstruktem nesoucím standardní *Cd36* alelu. V laboratoři profesora Levana byl *Cd36* konstrukt lokalizován v transgenní linii technikou FISH do oblasti 11q11. K přesnějšímu zamapování a určení místa inzerce *Cd36* transgenů jsme použili intercross populaci mezi transgenními liniemi a kongením kmenem nesoucím mutantní alelu *Cd36* od kmene SHR. Genotypizaci jsme provedli metodou PCR. Pro detekci *Cd36* konstruktů jsme použili primery amplifikující fragment 320 bp v oblasti exonu 5/6 podle potkaní-lidské homologie. Pro jeho zamapování jsme užívali primerů pro mikrosatelitní markery v oblasti jeho inzerce na chromosomu 11. Pro vyhodnocení výsledků genotypizace jsme využili počítačového programu MapManager QTX. Vazebnou analýzou jsme potvrdili inzerce *Cd36* konstruktů do intervalu mezi markery D11Rat20 a D11Rat21. Tento interval dlouhý 4 cM obsahuje minimálně 8 genových clusterů, jejichž regulační sekvence by mohly ovlivňovat genovou expresi *Cd36* konstruktů v transgenní linii.

Tato práce byla podporována grantem GA ČR 204/98/K015.

EFFECT OF MAGNESIUM SULPHATE ON ACUTE POSTHYPOXIC CHANGES OF CORTICAL EXCITABILITY IN EARLY RAT ONTOGENESIS

Autor: Tomáš Kalinčík

Školitel: doc. MUDr. Dana Marešová, CSc. - Fyziologický ústav 1. LF

■ Neuronal cell is extremely sensitive to the hypoxia. A certain damage of the function can be found in the activity of central nervous system.

The changes in the activity of rat brain were observed in 12-days and 25-days rats after exposure to a hypobaric hypoxia (duration: 60 min., pressure: 410 hPa). The effect of Magnesium Sulphate (0.3 g/kg i.p.; $MgSO_4$) on the duration of the epileptic seizures was monitored by electrocorticography. The exposure was followed by the periodic AC-stimulation (duration: 15 sec.; frequency 8 Hz; intensity: 3-5 mA) in right sensorimotor area and the measurement of the evoked cortical activity. The stimulation was repeated six times in one-minute intervals (timed from the end of each fit to the beginning of the next stimulation).

In the 12-days rats the average duration of evoked cortical seizures (ADs) reached: control group $23.5s \pm 0.89$ (mean value \pm S.E.M), hypoxia-group $21.5s \pm 2.02$, hypoxia+ $MgSO_4$ -group $14.9s \pm 1.50$. In the 25-days rats the ADs reached: in control-group $3.6s \pm 0.38$, hypoxia-group $7.9s \pm 0.93$, hypoxia+ $MgSO_4$ -group $5.2s \pm 0.65$. Due to the high SEM these values are not significant to prove the effect of $MgSO_4$ on the ADs.

The Magnesium Sulphate has no remarkable protective effect on the acute-hypoxia-injured neurones in rat brain. Duration of the seizures of the 12-days hypoxia-injured rats was rising after the first epileptic seizure (kindling). Magnesium Sulphate is able to eliminate the kindling. In the 25-days hypoxia injured rats no kindling was found, the 2nd, 3rd and 4th fits were significantly shorter than the 1st one. The duration of the seizures in the 12-days hypoxia-injured rats proved to be 273% longer than in 25-days animals in average.

Supported by MSM111100001.

The ADs of the single evoked fits in the 12-days rats hypoxia-group reached: Ist fit 12.4s, IInd 27.6s, IIIrd 23.5s., IVth 25.1s, Vth 20.4s, VIth 20.6s. The ADs of the single evoked fits in the 12-days rats hypoxia+MgSO₄-group reached: Ist fit 14.3s, IInd 15.9s, IIIrd 14.4s, IVth 14.8s, Vth 17.2s, VIth 12.9s

There are protective mechanisms activated after the first epileptic fit, which are able to shorten the period of the following seizure in older individuals (25days).

SUPRESE KRVETVORBY PŘI DIAGNÓZE AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE; VÝRAZNÁ SUPRESE ČERVENÉ A MEGAKARYOCYTÁRNÍ ŘADY U TEL/AML1+ AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE

Autoři: Ester Mejstříková, Tomáš Kalina, Jan Trka, Petr Smíšek, Jan Starý

Školitel: MUDr. Ondřej Hrušák, PhD. - Ústav imunologie 2. LF a FN Motol

■ **Úvod:** vznik akutní lymfoblastické leukémie (ALL) způsobuje supresi normální krvetvorby. Ta je zodpovědná za klinické projevy ALL. Vztah mezi leukemickými blasty a hostitelem je důležitý pro pochopení patogeneze ALL. Nenáhodné genetické aberace jsou příčinou rozdílného biologického chování leukemických buněk. Nebylo doposud zcela jasné, zda jednotlivé podtypy ALL mají odlišný vliv na nemaligní krvetvorbu.

■ **Metody:** do studie jsme zahrnuli všechny 102 pacienty léčené ve FN Motol v letech 1997-2001, data jednoho pacienta se nepodařilo získat. Analyzovali jsme tudíž data 101 dítěte. U každého pacienta jsme vyhledali minimální počet trombocytů, minimální hodnotu hemoglobinu a minimální a maximální počet leukocytů před zahájením léčby. Získaná data jsme porovnali podle podtypu ALL (zralá B ALL, T ALL, TEL/AML1+, hyperdiploidní, BCR/ABL+, MLL/AF4+ a non-hyperdiploidní bez zmíněných fúzních genů).

■ **Výsledky: bílá řada.** Potvrdili jsme již známý fakt, že MLL/AF4+ ALL i T ALL bývají spojeny s vysokým počtem leukocytů (průměrná hodnota maximální leukocytózy: 300.10⁹/l, respektive 239.10⁹/l). Naprostá většina pacientů s hyperdiploidní ALL měla poměrně nízký počet leukocytů. **Červená krevní řada.** TEL/AML1+ ALL korelovala v našem souboru se signifikantně nižší hodnotou hemoglobinu (p=0.0015). Průměrná hodnota byla 61 g/l s nápadně nízkou variabilitou (rozsah: 35 g/l-89 g/l). Hladina hemoglobinu u hyperdiploidní ALL měla bimodální rozvrstvení (1. modus 70 g/l, 2. modus 100 g/l). Skutečnost, zda se epidemiologicky jedná o bimodální rozvrstvení, se nyní snažíme potvrdit v populační celonárodní studii. **Krevní destičky.** Zjistili jsme, že TEL/AML1+ ALL se dále uniformně pojí i s nízkou hodnotou trombocytů (průměrná hodnota 38.10⁹/l, rozpětí 16-65.10⁹/l, p=0.0352). Oba BCR/ABL+ pacienti měli výraznou trombocytopenii (19.10⁹/l resp. 55.10⁹/l). U dalších podtypů bylo rozpětí hodnot trombocytů podstatně větší a rozdíly nebyly signifikantní.

■ **Závěr:** zjistili jsme, že podtyp ALL hraje roli v supresi normální krvetvorby před zahájením léčby. U TEL/AML1+ ALL byla významně suprimována krvetvorba červených krvinek a destiček. U dalších podtypů jsme takto nízkou variabilitu u některého z parametrů nezaznamenali.

ODPOVEDE MOZGOVEJ KÔRY NA BOLESTIVÚ STIMULÁCIU: ČASOVÁ A PRIESTOROVÁ LOKALIZÁCIA POMOCOU EEG A FMRI.

Autoři: Hubert Poláček, Jiří Vrána, Róza Rachmanová

Školitel: doc. PhDr. Andrej Stančák, CSc. - Ústav normální, patologické a klinické fyziologie 3. LF

■ **Úvod:** na špecifický krátkodobý bolestivý podnet ľudský mozog reaguje merateľnými zmenami elektrickej aktivity, prietoku krvi a metabolizmu.

Predložená práca vychádza z predpokladu že tieto zmeny v určitých oblastiach mozgu vykazujú minimálnu individuálnu variabilitu. Cieľom práce je lokalizovať funkčne odlišné oblasti aktivity mozgovej kôry kontralaterálne k pôsobiacemu elektrickému impulzu.

■ **Metodika:** 10 dobrovoľníkov (mužov, pravákov vo veku 22 ±4 rokov) bolo stimulovaných na ukazováku pravej ruky intradermálnou ihlovou elektródou. Intenzita prúdu bola nastavená 20% nad bolestivý prah a 20% nad senzorický prah v druhej časti experimentu. Odpoveď mozgu bola u každej osoby snímaná 88 kanálovým EEG (BrainScope®) a 1,5 T MR (Siemens Magnetom Vision). Pri oboch záznamoch bol použitý identický stimulačný protokol (pri bolestivej aj nebolestivej stimulácii 2 x 4 bloky klud-stimulácia, v každom bloku 24 fázických podnetov nasledovaných rovnako dlhou periódou kludu). S použitím programov BESATM, BrainVoyagerTM a Statistica 6.0 boli interaktívne prepojené a vyhodnotené obidva záznamy.

■ **Výsledky:** všetky záznamy ukázali pri bolestivej stimulácii významné aktívacie v okolí laterálnej fisúry. Primárna somato-senzorická oblasť bola pri bolestivej stimulácii významne aktivovaná len u 3 osôb. Rozdiely v priestorovej lokalizácii EEG a fMRI zdrojov boli v priemere menšie ako 2 cm.

U 8 osôb boli na základe oboch záznamov v okolí laterálnej fisúry rozlíšené 2 oddelené oblasti aktivácie: predná - s maximom aktivity v 78 ms, tangenciálnou orientáciou elektrického dipólu, lokalizovaná do frontálneho operkula v tesnej blízkosti inzuly a zadná - s maximom 115 ms, prevažne radiálnou orientáciou dipólu, lokalizovaná presne do sekundárnej soma-tosenzorickej oblasti. Predná oblasť vykazovala významné zvýšenie prietoku (fMRI) pri bolestivej stimulácii, zatiaľ čo pri nebolestivej stimulácii nebola významne aktivovaná.

■ **Záver:** výsledky štúdie ukázali dobrú kompatibilitu EEG a fMRI údajov. Kombinovaná analýza umožnila po prvýkrát rozlíšiť 2 funkčne odlišné oblasti aktivácie v okolí laterálnej fisúry kontra-laterálne k stimulovanému prstu. Oblasť vo frontálnom operkule v tesnej blízkosti inzuly bola aktivovaná skôr a prevažne len pri bolestivej stimulácii v porovnaní so sekundárnou somatosenzorickou oblasťou.

SPATIAL COGNITION AFTER SHORT-LASTING HYPOBARIC HYPOXIA

Autori: Pavel Říha, Michal Wittner

Školiteľ: prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.,

doc. MUDr. Dana Marešová, CSc.,

MUDr. et Mgr. Michal Wittner - Charles University in Prague,

First Faculty of Medicine,

Institute of Physiology

■ To enable a better understanding of the spatial learning and memory, we investigated the effect of the short-lasting hypobaric hypoxia on the spatial performance of rats in the Morris water maze. Male Wistar rats were exposed to the short-lasting 60-minute hypobaric hypoxia equivalent to the altitude of 7000 meters (23000 feet). The animals were divided into three groups, each group was subdivided by age (30 and 100 days) and there were at least seven subjects in each subgroup. The first group was exposed to the short-lasting hypoxia prior to the water maze training (acquisition group), while the second group received eight days of the pretraining in the water maze before the hypoxic stress (retention group). The last group was sham-treated animals (control group). We found the subjects after the hypoxic stress performed significantly better in comparison with the sham-hypoxic animals (the difference between the acquisition and the control group averaged over all training sessions was six seconds; $P < 0.002$, two-way ANOVA groups \times age). Further, the first day after the transient hypoxia, we observed slight (not significant) improvement of the spatial performance in the retention group compared to the control group. However, there were no statistically significant differences between the control and either the acquisition or the retention group after three months since the beginning of the experiment. While the overall performance of adult rats was significantly better, we have found no groups \times age interaction. Our findings are consistent with literature suggesting that the hypoxia acutely improves performance in tasks sensitive to spatial learning and memory and that both new learning and demonstration of an established place response are susceptible to such influences.

This study was supported by grants MSM 111100001 and FRVŠ 2452/2002.

ANATOMICKÁ STUDIE PRŮBĚHU N. DORSALIS PENIS/CLITORIDIS A JEHO VZTAHU K OS PUBIS

Autor: Jiří Šedý

Školiteľ: MUDr. Ondřej Naňka - Anatomický ústav 1. LF

■ Objasnení průběhu nervus dorsalis penis je základním požadavkem zachování nervově cévního svazku zásobujícího glans penis při chirurgické konverzi genitálu u pacientů s transexualismem. K preparaci průběhu nervu a ke sledování jeho vztahu k os pubis byla použita těla z pitevnických cvičení a mužské a ženské pánve ze sbírek Anatomického ústavu. N. dorsalis penis/clitoridis se odděluje z n. pudendus již po jeho výstupu z foramen infrapiriforme. Ve fossa ischioirecta-lis leží kranálně od n. pudendus a do trigonum urogenitale vstupuje podél mediálního okraje ramus inferior ossis pubis hluboko pod diaphragma urogenitale. Přetáčí se na laterální stranu crus corporis cavernosi penis/clitoridis mediálně od lig. fundiforme a začátku m. gracilis a pokračuje na dorsum penis/clitoridis. U muže podmiňuje n. dorsalis penis žlábek na mediální ploše r. inferior ossis pubis směřující anteromediokraniálním směrem. Pod dolním okrajem facies symphysialis se žlábek stáčí kranálně na přední plochu corpus ossis pubis, kde běží paralelně se symfýzou do poloviny její délky. Žlábek podmíněný průběhem n. dorsalis clitoridis se na rozdíl od žlábků pro n. dorsalis penis přetáčí na přední plochu corpus ossis pubis dříve a po corpus ossis pubis běží mediokraniálním směrem jen do dolní $\frac{1}{4}$ výšky facies symphysialis. Vztah nervus dorsalis penis/clitoridis k os pubis a tvar žlábků, který podmiňuje, je tedy rozdílný u obou pohlaví a může sloužit jako jeden z dalších známek pohlavního dimorfismu na pánvi.

TESTOVÁNÍ PROTINÁDOROVÝCH ÚČINKŮ PMEDAP *IN VITRO*

Autor: Michal Zápotocký

Školitel: doc. RNDr. Berta Otová, CSc., RNDr. Jitka Hanzalová - Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF a VFN

■ Tato práce je součástí studia protinádorových účinků látky 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurinu (PMEDAP, ÚOCHB AV ČR). PMEDAP je v buňkách fosforylován mitochondriální AMP-kinasou a cytoplasmatickou NDP-kinasou na PMEDAPpp, který je kompetitivním substrát-inhibitorem pol δ . Výsledkem je terminace DNA řetězce *de novo*. Cytostatický účinek PMEDAP byl testován na 4 buněčných liniích: REH (B leukemie), CCRF-CEM (T leukemie), HeLa (ca děložního čípku) a MRC5 (lidské embryonální fibroblasty). Hodnotili jsme přežití buněk za 24, 48 a 72 hodin po kultivaci s 0; 0,15; 0,3; 1,5; 3; 15 a 30 μg PMEDAP per ml média. Cytostatický účinek byl vyhodnocen XTT-testem. XTT, žlutá tetrazoliová sůl, je metabolizující buňkou přeměňován na oranžový formazan. Změna hodnoty absorbance po 4 hod působení XTT proto odpovídá množství přežívajících buněk. Kromě toho byla hodnocena indukce apoptózy po působení PMEDAP: (i) průtokovou cytometrií (FC) po barvení Annexinem V a (ii) vyšetřením DNA (fragmentace). Annexin se váže na fosfatidylserin, který je v časných fázích apoptózy exponován na povrchu buněk, a to v důsledku změn ve fosfolipidové dvojvrstvě membrán.

PMEDAP signifikantně potlačuje buněčnou proliferaci u všech 4 testovaných linií. Účinek je závislý na dávce PMEDAP a délce působení. Dávka 30 a 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ potlačí proliferaci u všech 4 linií. Buňky REH a CCRF-CEM byly k PMEDAP citlivější; k inhibici růstu došlo i při koncentracích 3 a 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Indukce apoptózy (FC) byla prokázána pouze u linií REH a CCRF-CEM; fragmentace DNA však nebyla nalezena u žádné ze studovaných linií.

1. místo**ZVLÁŠTNÍ CENA ZDRAVOTNICKÝCH NOVIN****HUNTINGTONOVA NEMOC: ANALÝZA VZTAHŮ MEZI KLINICKÝMI PROJEVY, ANAMNESTICKÝMI DATY A VÝSLEDKY POMOCNÝCH VYŠETŘOVACÍCH METOD**

Autor: J. Klempíř

Školitel: doc. MUDr. Jan Roth, CSc. - Neurologická klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod:** Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, projevující se progresivním postižením motoriky, intelektu a psychiatrickými abnormalitami. Prevalence HN je 1:20 000. Nejčastěji se manifestuje mezi 35. - 45. rokem věku a medián přežití se pohybuje okolo 15 - 18 let. Patologický gen je lokalizován na chromozomálním lokusu 4p16.3, kde dochází k nadměrnému zmnožení počtu (CAG)_n tripletů (>41), které dávají vznik polyglutaminové sekvenci kódující protein huntingtin. Na CT nebo MRI je charakteristická ztráta konvexity předních rohů postranních komor a jejich balónovité rozšíření, k čemuž dochází v závislosti na atrofizaci ncl. caudatus. Kauzální léčba HN dosud neexistuje.

■ **Soubor a metodika:** vyšetřili jsme soubor 80 pacientů s HN potvrzenou genetickým vyšetřením (34 mužů a 46 žen) a porovnali jej se souborem 43 norem (14 mužů a 29 žen). U všech osob byla pomocí CT v orbitomeatálním sklonu měřena největší plocha caput nuclei caudati (CNC). Velikost plochy CNC byla stanovena manuálně pomocí kurzoru a funkcí TRACE a ROI. Retrospektivně z dokumentace a z informací od nemocných a rodinných příslušníků byly získány informace ohledně věku na počátku nemoci a délky trvání onemocnění, charakteru dědičnosti ve smyslu maternální či paternální heredity, charakteru iniciálních symptomů nemoci (psychiatrických nebo motorických). Počet (CAG)_n tripletů byl stanoven genetickou analýzou DNA z periferních leukocytů. Nashromážděná data byla vyhodnocena pomocí standardních statistických metod (F test, t test, korelační analýza, Mann-Whitneyův test, uni-ANOVA a Kolmogorovova - Smirnovova testu pro jeden výběr).

■ **Výsledky:** velikost plochy CNC je signifikantně menší ve srovnání s normami ($p < 0,001$). Počet (CAG)_n tripletů výrazně inverzně koreluje s klinickým počátkem HN ($\alpha = 0,001$). Velikost atrofie CNC signifikantně inverzně koreluje s délkou trvání HN ($\alpha = 0,001$). Přirozená atrofie CNC u zdravých osob rovněž inverzně koreluje s věkem ($\alpha = 0,01$), ale nikdy nedosáhne míry atrofie CNC jako u HN. Počet (CAG)_n tripletů není rozhodující pro to, jestli iniciální symptomy HN budou neurologické či psychiatrické. Nebyla pozorována závislost mezi paternální nebo maternální hereditou a počtem (CAG)_n tripletů u nemocných s HN. Rovněž typ heredity neovlivňuje věk na počátku HN. Věk nemocných na počátku HN není závislý na iniciální neurologické či psychiatrické symptomatice.

■ **Závěr:** planimetrie CNC významným způsobem přispívá k diferenciální diagnostice HN, neboť existuje jen několik málo dalších neurodegenerativních onemocnění, které klinickou symptomatologií a současným výskytem atrofie CNC mohou připomínat HN.

2. místo**DIAGNOSTICKÝ A TERAPEUTICKÝ PŘÍSTUP K ALERGIÍ NA BÍLKOVINU KRAVSKÉHO MLÉKA V DĚTSKÉM VĚKU**

Autor: Tereza Fuchsová

Školitel: prim. MUDr. Pavel Frůhauf, CSc. - Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF a VFN

■ Alergie na bílkovinu kravského mléka (ABKM) je jednou z nejčastějších potravinových alergií v dětském věku. Podle různých epidemiologických studií trpí tímto onemocněním 2-3% kojenců. Počet dětí s ABKM s věkem klesá a u většiny (80%) se do předškolního věku rozvine tolerance. Klinická manifestace ABKM může být kožní, gastrointestinální nebo respirační, často se mohou tyto projevy kombinovat. Zásadní problém spočívá v tom, že ABKM znemožňuje kojencům přijímat jejich výhradní stravu - mléko.

Cílem této studie je prezentace diagnostického a terapeutického postupu, provedení analýzy sebraných dat, jejich vyhodnocení a srovnání s výsledky zahraničních studií. Dalším záměrem bylo potvrzení vztahu mezi výskytem ABKM a délkou plného kojení.

Studie se zúčastnilo celkem 21 dětí se suspektní ABKM, vyšetřených na gastroenterologické ambulanci. U zmíněného souboru byla odebrána anamnéza se zaměřením na určení doby zavedení kravského mléka do výživy, výskytu rodinné alergické zátěže, doby zavedení terapeutického proteinového hydrolyzátu. Bylo provedeno fyzikální vyšetření, především zhodnocení stavu výživy. Terapeuticky byla všem dětem ze stravy eliminována bílkovina kravského mléka a nasazen proteinový hydrolyzát.

Rozborem dat jsme mimo jiné zjistili, že u většiny (15) dětí bylo (oproti běžnému průměru v ČR) předčasně ukončeno kojení, u stejného počtu dětí pak došlo k rozvoji příznaků ještě před 3.měsícem věku. U 7 dětí byla navíc zjištěna

pozitivní rodinná alergická zátěž. U 3 dětí došlo během studie k rozvoji tolerance. Z hlediska klinických projevů se u 15 dětí rozvinuly gastrointestinální příznaky, 6 dětí mělo příznaky kožní. Respirační příznaky se ve sledovaném souboru nevyskytovaly.

2. místo

PARANEOPLASTICKÉ AUTOPROTILÁTKY - METODIKY, PRVNÍ ZKUŠENOSTI

Autor: Zdenka Vaňková

Školitelé: RNDr. Ivana Janatková,

prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc.

- Ústav klinické imunologie a mikrobiologie 1. LF a VFN

■ **Úvod:** paraneoplastické syndromy - incidence, výskyt Neurologické paraneoplastické syndromy - přehled, incidence uváděná v literatuře, charakteristika jednotlivých syndromů, asociované karcinomy, výskyt paraneoplastických autoprotilátek u těchto syndromů.

Paraneoplastické antineuronální autoprotilátky - přehled základních autoprotilátek (ANNA-1, ANNA-2, PCA-1, anti-MAG, anti-GAD), charakteristika hlavních autoantigenů, kritéria rozpoznání jednotlivých autoprotilátek v metodě nepřímé imunofluorescence, karcinomy nejčastěji asociované s výskytem paraneoplastických autoprotilátek.

■ **Metodika a materiál:** použity 2 metody - metoda nepřímé imunofluorescence a Westernblot - princip metod, konkrétní postup, využitý substrát, zhodnocení a porovnání obou metod, jejich výhody a nevýhody, možná diagnostická úskalí.

■ **Výsledky:** přehled výsledků stanovení paraneoplastických autoprotilátek u sledovaných pacientů s autoimunitním onemocněním (roztroušená skleróza, diabetes mellitus), porovnání se souborem zdravé populace, porovnání výsledků obou metod u stejných pacientů.

■ **Závěr:** zhodnocení výsledků, porovnání s očekávanými údaji, možnost rutinního stanovení antineuronálních paraneoplastických autoprotilátek a jeho význam, možné využití v časně diagnostice nádorů.

3. místo

KOUŘENÍ, PREVENTIVNÍ KARDIOLOGIE A GYMNAZISTI

Autor: Lenka Bošanská

Školitel: MUDr. Eva Králíková, CSc. - Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

■ **Úvod:** kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou příčinou stále více než 50% úmrtí v rozvinutých zemích, proto zasluhují naši pozornost. Víme, že řada z rizikových faktorů (RF) KVO je ovlivnitelná. Moje práce spočívala v informování studentů gymnázií o možnostech prevence KVO, se zaměřením na souvislosti kouření. Jejich vlastní znalosti jsem hodnotila podle anonymního dotazníku. Součástí návštěv ve školách byla diskuse a ukázka objektivizace některých RF (krevní tlak, CO ve vydechaném vzduchu).

■ **Metodika:** první fázi projektu představoval anonymní dotazník s 15 otázkami, které vyžadovaly samostatné slovní vyjádření studentů středních škol. Chtěla jsem zjistit aktivní znalost základních pojmů související s RF KVO, pozitivní i negativní příklady z vlastního životního stylu mladých lidí, vlivu kouření, stresu, výživy. Dotazník jsem vyhodnotila a podle výsledků byl upraven obsah přednášek. Hlavní částí projektu je přednáška spojená s diskusí vždy v 1 třídě vybrané střední školy. Omezený počet studentů umožňuje lepší komunikaci a aktivní účast. Přednášejícími byli studenti 5. ročníku 1. LF UK v rámci terénní praxe stáže z hygieny a několik individuálně připravených studentů 4. a 5. ročníku. Přednášky na téma prevence KVO a kouření se uskutečnily na 5 gymnáziích v Praze a okolí a jedné vyšší odborné škole v Praze. Struktura výkladu: úvodní vysvětlení základních pojmů v problematice KVO, s důrazem na nedostatky zjištěné v dotazníku, dále základní nosologické jednotky KVO, které jsou ovlivnitelné životním stylem, část věnovaná kouření a dalším rizikovým faktorům. Závěr přednášky byl vyhrazen pro diskusi a vyplnění krátkého dotazníku jako rychlou zpětnou vazbu, pochopení výkladu a vysvětlovaných pojmů.

■ **Výsledky:** znalosti problematiky KVO jsou v cílové skupině spíše pasivní a chápány jako teorie, mladí lidé nemají pocit, že se jich riziko přímo dotýká. Diskuse se zúčastňovali aktivně, problematika je zajímavá. Na otázku, jestli změní způsob života (např. kouření), se většinou vyjadřovali nepřesvědčivě, že se pokusí, nebo záporně. Pro nás to byla zajímavá zkušenost v jednání s dospívajícími a nacházení způsobu, jak je zaujmout. Dál se soustředíme na podporu a větší motivaci mládeže k aktivnímu předcházení rizikovým faktorům KVO.

■ **Závěr:** obecně se naše přednášky setkaly s kladným přijetím středoškoláků a pozitivním hodnocením ředitelů a učitelů navštívených škol. Někteří projevíli zájem o další spolupráci. Projekt pokračuje dál v rámci IFMSA CZ jako projekt Public Health, podobným způsobem je realizován na Lékařské fakultě UK v Plzni.

BEZ OCENĚNÍ:**KOURENÍ, TĚHOTENSTVÍ A PLOD****Autoři:** Nina Rašlová, Jana Bajerová**Školitel:** MUDr. Eva Králíková, CSc. - Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

■ **Úvod:** kouření je významným rizikovým faktorem během těhotenství, a to nejen pro matku, ale i pro plod. Bohužel, mezi našimi těhotnými ženami kouří až 20%.

■ **Metodika:** navštěvovaly jsme poporodní oddělení Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a metodou řízeného pohovoru jsme zjišťovaly data týkající se kouření v těhotenství, porodu i znalostí a názorů matek na vliv kouření v těhotenství na plod. Objektivizace kouření měřením CO ve vydechaném vzduchu.

■ **Výsledky:** z 98 matek, které byly v období šetinedělí po porodu (většinou 2-3 dny) kouřily pravidelně 3, příležitostně 5 a bývalých kuřáček bylo 30. Znalosti matek o vlivu kouření na plod byly alarmující, jejich aktivní zájem byl nízký. Našimi informacemi byly překvapeny. Jejich gynekologové se na jejich kouření většinou ptali, kuřáčkám však radili často jen kouření omezit (ne přestat).

■ **Závěr:** v našem souboru byla prevalence kouření nižší, než se uvádí, znalosti matek o vlivu kouření na plod však velmi malé.

HODNOCENÍ REPLIK KOVOKERAMICKÝCH KORUNEK V ELEKTRONOVÉM RASTROVACÍM MIKROSKOPU DVA ROKY PO ZHOTOVENÍ**Autor:** Radek Hippmann**Školitel:** doc. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc. - Stomatologická klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod:** ošetření pomocí kovokeramických korunek je velmi stabilní sanací z hlediska spojení kovové konstrukce a fazety. Vrstva glazury by měla chránit korunku před agresivním prostředím dutiny ústní, hladký povrch náhrady omezuje usazování zubního povlaku. Nevýhodou z hlediska životnosti fixní náhrady je zvýšená tvrdost tohoto materiálu. Cílem studie bylo objektivně zhodnotit stav keramické sanace po dvou letech užívání v dutině ústní.

■ **Materiál a metoda:** dva roky po zhotovení jsme klinicky vyšetřili skupinu 52 kovokeramických korunek. Potom jsme je otiskli adiční silikonovou hmotou a v laboratoři jsme zhotovili repliky situace v dutině ústní. V elektronovém rastrovacím mikroskopu Jeol 5500 LV jsme hodnotili stav okluze - okluzní reliéf, anatomický tvar, vestibulární a orální plochu korunky i oblast krčkového uzávěru. Posun okraje korunky v oblasti krčkového uzávěru nelze měřit v elektro-novém rastrovacím mikroskopu, a proto jsem použili srovnávání se standardním modelem Ivoclar-Williams.

■ **Výsledky:** po dvou letech většina korunek vykazuje jen malé známky klinického opotřebení. V rastrovacím elektro-novém mikroskopu jsou hrbolky dobře formovány. Mezihrbolkové rýhy jsou lehce vyhlazeny. Vestibulární plocha keramické korunky je stejně hladká jako povrch vlastního zubu. Klinicky patrná štěrbina v oblasti krčkového uzávěru, měkká spodina a tmavé zabarvení signalizuje přítomnost kazu. Ten lze jednoznačně potvrdit i nálezem na replice tvrdých i měkkých tkání. Po dvou letech je zřejmé, že proces abraze v kombinaci se fyziologickou změnou v oblasti marginální gingivy vede ke vzniku štěrbin v oblasti krčkového uzávěru. Ta se pohybuje v rozmezí 45,0 um - 108,3 um. Závažnější posun jsme našli vestibulárně (89,1 (SE 12,1) proti 63 um orálně (SE 7,0). Tento rozdíl je statisticky významný.

■ **Diskuse a závěry:** proces abraze i s průběh fyziologických změn v oblasti krčkového uzávěru s sebou přináší objektivní změnu povrchu korunky i signifikantní změnu polohy okraje korunky.

ZPRÁVA O VÝSKYTU KOURENÍ A JEHO ROZLOŽENÍ PODLE VĚKU A POHLAVÍ MEZI STUDENTY GYMNÁZIA NA PRAŽAČCE, PRAHA 3**Autor:** Jana Knížková**Školitel:** MUDr. Eva Králíková, CSc. - Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

■ **Úvod:** kouření je nejvýznamnější preventabilní příčinou smrti. Prevalence vzrůstá zejména mezi mládeží. V ČR stále chybí komplexní zákon na kontrolu tabáku, nyní se diskutuje o zákazu reklamy na tabákové výrobky.

■ **Metodika:** Studenti 1.a 4. roč. se zúčastnili 2 navazujících besed o kouření a odvykání, vlivu na zdraví a životním stylu. Na závěr vyplnili dotazník - viz výsledky (N = 92).

■ **Výsledky:** z 92 dotázaných (70 z 1. roč., 22 z 4. roč.) si nejméně jednou zapálilo 77, tedy 83,7%, přičemž mladší nápadně vedou - v mladší skupině 82,9% (N = 70), na rozdíl od starších, kde jde o 77,3% (N = 22). Z dívek (celk. 59, 45 ml., 14 st.) si jich alespoň 1x zapálilo 51, tedy 86,4%, přičemž trvale kouří 17 dívek (12 pravid. v prům. 10-20 cig./den - sedm z této dvanáctky je mladších 16 let !, a 5 kouří příležitostně v intervalu 1/týd. až 1/měsíc s tend. ke kratším

intervalům; 28.8% resp. 20.3% - denně). Z 33 hochů si alesp. 1x zapálilo 24, tedy 72.7%, kouří 8 (7 pravid., 1 přílež.; 24.2%, resp. 20.3%). Tristním zjištěním je, že z oněch 77 si jich 67 zapálilo do 15. roku (28 z nich před dovrš. 12ti let, povětš. dívky). Dívky vedou i v užití dalších drog, kdy marihuanu vyzkoušelo téměř 50% mladších a asi 45% starších dětí, v tvrdých drogách pak opět vedou dívky 1. r., 13.3%, za hochy 4. r. 12.5% (násl. dívky 4. r. 7.1%, hoši 1. r. 4%).

■ **Závěr:** nejvíc kouří mladší dospívající, především dívky. Ty jsou i nejčastějšími uživatelkami tvrdých drog v jejich širokém spektru. Zvláštní je, že ve většině případů pocházejí děti-kuřáci z úplných rodin vysokoškoláků nekuřáků, a zčásti i jejich sourozenci kouří. Je tedy na místě zamyslet se nad tím, jak funguje rodina či prevence v ní a celospolečnosti a nakolik je účinná legislativa.

ZAVEDENÍ IMUNOFENOTYPIZACE LYMFOCYTŮ BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽE NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU V LABORATOŘI ÚSTAVU IMUNOLOGIE A MIKROBIOLOGIE

Autor: Veronika Mazáková

Školitel: MUDr. Helena Marečková, CSc.

- Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF a VFN

■ Bronchoalveolární laváž (BAL) je neinvazivní metoda, při níž se při bronchoskopii instiluje a opět aspiruje 150 - 300 ml fyziologického roztoku. Provádí se nejčastěji v oblasti středního laloku, v případě lokalizované choroby v postižené oblasti. Lavážní tekutina je získaná z úrovně bronchiolů a alveolů. Lze v ní mimo jiné hodnotit i krevní elementy. Imunofenotypizační vyšetření využívá možnosti značení povrchových, ale i intracelulárních molekul monoklonálními protilátkami a jejich detekci pomocí průtokového cytometru. Vyšetření periferní krve jen nedokonale odráží změny, které probíhají v místě zánětu, a proto bylo mou snahou zavést imunofenotypizační vyšetření bronchoalveolární laváže, jako nejbližšího dostupného kompartmentu zánětlivých změn u plicních chorob.

Pro vyšetřování BALu pomocí průtokového cytometru nelze použít standardní postup značení a zvláště vyhodnocování, proto jsem musela na počátku mé práce řešit několik metodických problémů: bylo potřeba použít vhodný filtr k odstranění fibrinu a ověřit možnost skladování vzorku do druhého dne. Při vyšetřování periferní krve se používá rutinní program hodnotící pouze 2 typy fluorescence. Tento postup nelze pro imunofenotypizační vyšetření BALu použít, protože je nutné hodnocení více parametrů najednou, tedy 3 typy imunofluorescenčního značení, kdy využíváme panleukocytární znak CD45 k výběru hodnocené populace.

Celkem jsem vyšetřila 30 pacientů s různými diagnózami plicního postižení a své výsledky jsem porovnávala s literárními údaji, s diagnózou a klinickým stavem pacientů.

V současnosti se v světě používá imunofenotypizační vyšetření nejčastěji pro diferenciální diagnostiku sarkoidóza vs. jiné fibrotizující procesy: u sarkoidózy je index CD4/CD8 větší než 3, u ostatních fibrotizujících procesů menší než 0,5 (u různých autorů různé). K jeho poklesu nebo inverzi může dojít u polékového poškození nebo hypersenzitivní pneumonitis.

Vyšetření poměru pomocných a cytotoxických buněk je důležité pro diferenciální diagnostiku. Zastoupení aktivačních znaků (chemokinové receptory, HLA-DR) je pomůckou při odhadu aktivity procesu a monitoraci odpovědi na terapii.

MEDICI A KOUŘENÍ

Autor: Petr Nesnídal

Školitel: MUDr. Eva Králíková

- Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

■ Příčina každého pátého úmrtí v České republice - kouření tabáku - by měla být tématem všech oborů medicíny.

Na 1. LF UK mají medicí v prvních třech ročních teoretické předměty, kde se o kouření mluví jen okrajově, v 5. ročníku je 4-6ti hodinový seminář o kouření (epidemiologie, prevalence, vliv na zdraví, princip kuřáctví, metody odvykání kouření, legislativa,...), eventuálně někteří z nich zpracovávají samostatnou epidemiologickou práci na téma kouření v různých souvislostech (prevalence u lékařů a sester, problémy anesteziologie u kuřáků atd.), někteří pomáhají v naší poradně pro odvykání kouření.

Na naší fakultě se sleduje prevalence kuřáctví v 5. ročníku pravidelně od roku 1989: mezi bylo to stále 20% kuřáků, ve školním roce 1997/98 jen 15%, ve šk. roce 2000/2001 jen 12%, a poslední 3 roky i mezi studenty 1. ročníků: v roce 2000/2001 to bylo 25%, v roce 2001/2002 to je 23% a tento trend snižování prevalence kouření mezi mediky stále pokračuje jak mezi studenty 5. i 1., ale udivující je rozdíl prevalencí mezi ročníky samotnými!

Jako posluchač 4. ročníku medicíny se snažím zmapovat poskytování informací o souvislostech kouření a zdraví během celého studia, eventuálně bych se rád spolu s některými učiteli fakulty pokusil prosadit větší prostor pro tento rizikový faktor ve výuce.

KLINICKÉ HODNOCENÍ KOVOKERAMICKÝCH NÁHRAD DVA ROKY OD ZHOTOVENÍ

Autor: Jakub Stebel

Školitel: doc. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc. - Stomatologická klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod:** ošetření kovokeramickými korunkami tedy tvoří ve světě již déle než 40 let standard ošetření fixní protetickou prací. Cílem studie bylo objektivizovat reálnou kvalitu kovokeramické konstrukce se slitinou z obecného kovu, která v naší republice tvoří jedno ze základních ošetření v běžné klinické praxi. Pro hodnocení jsme stanovili dobu dvou let, tedy interval, kdy by podle předpokladu EU harmonizovaného Obchodního zákoníku měla v budoucnu fixní náhrada zůstat v dutině ústní v optimální klinické kvalitě.

■ **Materiál a metoda:** sestavili jsme soubor 52 korunek u 19 pacientů (14 žen a 5 mužů) z keramického materiálu Vita Omega (VITA) a chrómkobaltniklové slitiny Wiron (Bego). Vodítkem pro výběr pacienta byl laboratorní štítek s popisem konstrukce včetně materiálu. Korunky byly zhotoveny před 2 lety.

Pacienti byli poučeni o spolupráci v klinické studii. Nejprve jsme vyplnili záznamovou kartu o typu rekonstrukce. Dále jsme provedli jsme fotodokumentaci (Dental EYE, Yashica). Stav parodontu jsme vyjadřovali pomocí indexu CPITN. Podle US Public Health Servis System hodnocení jsme připravili a vyplnili dotazník charakterizující sanaci.

■ **Výsledky:** klinické vyšetření lze shrnout do následujících bodů. Okraj korunky je v úrovni marginální gingivy (34,6 %) nebo nad ním (65,4 %). Není rozdíl v hodnocení vestibulární (34,6 %; 65,4 %) a orální plochy zubu (32,7 %; 59,6 %). Tato lokalizace s sebou téměř nenese nebezpečí vzniku sekundárního kazu (1,9 %). Korunky po dvou letech jsou převážně intaktní (96,2 %), pouze ve dvou případech (3,8 %) jsme našli prasklinu, která však neobnažovala kovovou slitinu. Korunky nezměnily anatomický tvar, ani barvu. Optimální přesnost adaptace korunky jsme detekovali v 71,2 %, sonda se zachytávala v 26,9 %, u jedné korunky jsme našli štěrbinu v oblasti krčkového uzávěru (1,9 %).

■ **Diskuse a závěry:** výsledky studie prokázaly, že pacientovi můžeme garantovat plnou dvouletou záruku na kovokeramickou fixní korunku.

1. místo**DVOJÍ ÚČINEK APOCYNINU: INHIBITOR FAGOCYTÁRNÍ NADPH OXIDÁZY, STIMULÁTOR PRODUKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU V NEFAGOCYTECH**

Autoři: Martin Vejražka, Radan Míček

Školitel: prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc. - Ústav lékařské biochemie 1. LF

■ Apocynin je přirozeně se vyskytující metoxy-substituovaný katechol, který se experimentálně používá jako inhibitor NADPH oxidázy. Jakkoli má výrazný inhibiční efekt ve studiích s neutrofily a makrofágy, nepůsobí jako inhibitor v nefagocytárních buněčných systémech. V našich pokusech dokonce stimuloval produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) fibroblasty cévní stěny. V experimentech s makrofágy apocynin způsobil zvýšení produkce ROS stanovené pomocí dichlordihydrofluoresceinu (DCFH) během prvních 15 minut. Poté měl naopak inhibiční účinek, takže se zdá, že byl v přítomnosti leukocytární myeloperoxidázy a H_2O_2 přeměněn na jinou sloučeninu. Apocynin předem oxidovaný H_2O_2 a peroxidázou z křenu (HRP) měl bezprostřední inhibiční efekt na produkci ROS. V nefagocytech apocynin stimuloval produkci ROS a inhibiční účinek nebyl zaznamenán ani po 60 minutách. Apocynin uměle preaktivovaný H_2O_2 a HRP však snížil produkci ROS podobně, jako tomu bylo u makrofágů. Stimulační účinek na produkci ROS byl potlačen tironem a superoxidodismutázou (SOD), takže se zdá, že produkovaná ROS je superoxid ($O_2^{\cdot-}$). Vliv apocyninu inhibovalo i difenyljenjodinium (DPI), inhibitor NADPH oxidázy bez scavengerového efektu.

Lze shrnout, že apocynin stimuluje produkci $O_2^{\cdot-}$ buňkami. V přítomnosti peroxidázy a ROS je však konvertován na jinou sloučeninu, inhibující produkci $O_2^{\cdot-}$. Lze předpokládat, že za podmínek *in vivo* apocynin může mít opačný účinek na fagocyty a nefagocyty: působí jako inhibitor fagocytární NADPH oxidázy, avšak také jako stimulant produkce ROS v nefagocytech.

2. místo**ANALÝZA MUTACÍ U NEMOCNÝCH S PORFYRIÍ VARIEGATOU**

Autoři: E. Maloňová, R. Rosipal, J. Zeman, P. Martásek

Školitel: doc. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

- Klinika dětského a dorostového lékařství a Centrum integrované genomiky 1. LF a VFN

■ Porfyria variegata (PV) je autozomálně dominantní akutní jaterní porfyrie způsobená částečným defektem protoporphyrinogen oxidázy (PPOX), enzymu metabolické cesty syntézy hemu. Onemocnění má neúplnou penetranci, je charakterizováno různě závažnou kožní symptomatologií a akutním neuroviscerálním syndromem připomínajícím náhlé příhody chirurgické, gynekologické, neurologické a psychiatrické. Klinicky manifestní pacienti vykazují typickou fluorescenci plasmy při 626 nm, mají zvýšené porfyriny ve stolici a během akutních atak mohou mít zvýšené hodnoty prekurzorů porfyrinů v moči. U heterozygotních pacientů je aktivita PPOX v různých tkáních snížena přibližně na 50% normální aktivity. Gen pro PPOX se nachází na chromozomu 1q22-23, gen zaujímá přibližně 5 kb, skládá se z 13 exonů, cDNA kóduje protein skládající se z 477 aminokyselin. U 6 rozvětvených českých rodin s klinicky a biochemicky diagnostikovanou porfyrií variegatou jsme pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) a následným sekvenováním vzorků s atypickým DGGE profilem identifikovali patogenní mutace v genu pro PPOX. Nalezli jsme 4 nové, dosud nepopsané mutace, z toho 1 delecí (1393 del 8 bp), 1 mutaci způsobující alternativní sestřih (IVS 6+1G→A) a 2 mutace způsobující záměnu jedné aminokyseliny (W227G, C459Y). Přestože příbuznost není známa, delecí 8bp v pozici 1393 jsme identifikovali u dvou vyšetřovaných rodin. V poslední rodině jsme našli již popsanou mutaci 1177 del G. Funkční dopad obou mutací způsobujících změnu aminokyselinového složení proteinu jsme otestovali pomocí exprese v prokaryotickém expresním systému. Expres variantních proteinů v systému *E. coli* prokázala absenci enzymatické aktivity u těchto dvou mutací, což je v souladu s cca 50% aktivitou PPOX vyskytující se u heterozygotních pacientů a potvrzuje kauzálnost těchto mutací. Dostupnost molekulárně genetického vyšetření zajistí přesnou diagnosu u všech bezpříznakových nosičů genu a výrazně tak omezí možnost vzniku život ohrožující ataky onemocnění.

Podpora grantem GAUK 5/00/c.

3. místo**LAMINS A/C ARE NOT ESSENTIAL FOR SPECKLE MORPHOLOGY**

Autoři: Jaromíra Večeřová, Karel Koberna, Jan Malínský,

Ivan Raška - Institute of Experimental Medicine, AV CR, Prague, Czech Republic and Laboratory of Gene Expression, Charles University in Prague - First Faculty of Medicine, Czech Republic,

Tom Misteli - National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, USA)

Školitel: prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc. - Institute of Experimental Medicine, AV CR, Prague, Czech Republic and Laboratory of Gene Expression, Charles University in Prague - First Faculty of Medicine, Czech Republic

■ Nuclear lamins are the major component of the nuclear lamina, but also play an important role in the functional organization of the interior of the cell nucleus. We have tested whether lamin A/C contributes to the organization of pre-mRNA splicing factor compartments. Using lamin A/C negative mouse embryonic fibroblasts we show that loss of lamin A/C has no significant effect on the distribution of several pre-mRNA splicing factors and does not affect speckle morphology as examined by light and electron microscopy. Time-lapse microscopy suggests that the dynamic properties of speckles are unchanged upon loss of lamin A/C and FRAP analysis demonstrates that the mobility of SF2 splicing factor is the same in lamin A/C positive and negative cells. Furthermore, speckles persist after nuclear matrix preparation both in lamin positive and negative cell lines. These results demonstrate that lamins A/C are not essential for speckle morphology.

BEZ OCENĚNÍ:

ODLIŠNÝ MECHANISMUS INHIBICE EXPRESE INDUCIBILNÍ SYNTÁZY OXIDU DUSNATÉHO CYKLOSPORINEM A A FK 506 V PRIMÁRNÍCH KULTURÁCH POTKANÍCH HEPATOCYTŮ

Autor: Nikolína Canová

Školitel: prof. Dr. Farghali H., DrSc. - Farmakologický ústav 1. LF

■ Nejasná úloha NO během endotoxémie doprovázející jaterní poškození stále zůstává důležitou oblastí hepatologického výzkumu. Cílem této práce proto bylo porovnat vliv cyklosporinu A (CsA) a FK 506 na expresi inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS) v hepatocytech stimulovaných prozánětlivými látkami. Primární kultury potkaních hepatocytů byly po stabilizaci rozděleny do tří skupin: 1. kontrolní, 2. stimulované lipopolysacharidem (LPS 5 µg/ml) nebo cytokinovou směsí (CS: TNF-α 500 U/ml, IL-1β 200 U/ml, IFN-γ 100 U/ml), 3. CsA nebo FK 506 (0.1 a 1 µg/ml) + LPS/CS. Po 24-hodinové kultivaci byla změřena koncentrace urey, ALT a nitritů (NO₂⁻), stabilních produktů NO, uvolňovaných do kultivačního média. Z hepatocytů byla izolována celková RNA a metodou RT-PCR stanovena exprese iNOS genu. Preinkubace s CsA významně potlačila expresi iNOS-mRNA navozenou LPS nebo CS, zatímco preinkubace s FK 506 neměla vliv na expresi iNOS-mRNA. CsA (0.1 a 1 µg/ml) signifikantně snížil LPS nebo CS indukovaný nárůst hladin NO₂⁻ o 21%, resp. o 31%, zvýšil vyplavování ALT a snížil biosyntézu urey. FK506 snížil v závislosti na koncentraci produkci NO₂⁻ o 3% až 22%. Naše výsledky prokázaly, že CsA a FK 506 inhibují expresi iNOS odlišným způsobem: CsA působí na transkripční úrovni, kdežto FK 506 působí posttranskripčně, a že NO produkovaný během endotoxémie a za daných experimentálních podmínek může chránit hepatocyty před buněčným poškozením. Proto by s ohledem na možné terapeutické důsledky měla být také v klinické praxi věnována pozornost modulaci iNOS.

BIOCHEMICKÁ A MOLEKULÁRNÍ STUDIE U DĚTÍ S PORUCHAMI GLYKOSYLACE

Autoři: T. Honzík, E. Maloňová, M. Tesařová

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.

- Klinika dětského a dorostového lékařství a Centrum integrované genomiky 1. LF a VFN

■ Dědičné poruchy glykosylace proteinů (CDG syndrom, „congenital disorders of glycosylation“) je nová skupina metabolických onemocnění s multisystémovým postižením, které vzniká na podkladě poruch syntézy glykoproteinů. Klinicky se CDG syndrom nejčastěji manifestuje již v kojeneckém věku neprospíváním, psychomotorickou retardací, ataxií, neuropatií, pigmentovou degenerací sítnice, vpáčenými mammilami a hepatopatií. V našem sdělení předkládáme výsledky biochemických a molekulárních vyšetření u čtyř dětí s dědičně podmíněnou poruchou glykosylace proteinů.

■ **Materiál a metody:** na doporučení ošetřujících lékařů z celé ČR jsme v roce 2001 vyšetřili 102 dětí s klinickým podezřením na CDG syndrom. Sérové zastoupení asialovaných a nízkosialovaných transferrinů bylo studováno turbidimetricky pomocí kitu (ChronAlco I.D II - CDT test) a isoelektrickou focusací s imunodetekcí. Molekulárními metodami byl analyzován gen pro fosfomannomutázu 2.

■ **Výsledky:** poruchu glykosylace proteinů jsme na biochemické úrovni prokázali u čtyř dětí a dosavadní molekulární vyšetření objasnila molekulární podstatu onemocnění u dvou sourozenců s mutací 422 G >A/357C>A v exonu 5 genu pro fosfomannomutázu 2. U postižených dětí se onemocnění manifestovalo od novorozeneckého věku neprospíváním, mírnou kraniofaciální dysmorfii, invertovanými mammilami, slabostí, těžkou psychomotorickou retardací, epilepsií, svalovou hypotonií, mikrocefalií a hepatopatií. U dvou dětí se rozvinula ataxie, jeden chlapec má kardiomyopatii

s perikardiálním výpotkem, u jedné dívky byla zjištěna hypoplázie mozečku a reninitis pigmentóza.

■ **Závěr:** klinické příznaky dětí s CDG syndromem jsou heterogenní a jejich prognóza není příznivá. Skríníngovou metodou pro diagnostiku CDG syndromu je stanovení spektra asialovaných a nízkosialovaných transferrinů v séru turbidometrickou imunoesejí nebo isoelektrickou fokusací. Pro potvrzení diagnózy a upřesnění, o který typ onemocnění se jedná, je nutné enzymatické a/nebo molekulární vyšetření.

Práce vznikla s částečnou podporou projektu GA-UK 3/2002/C.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK A VÝVOJ OBSTRUKČNÍHO HYDROCEFALU U TUMORŮ ZADNÍ JÁMY DĚTSKÉHO VĚKU

Autor: Hořínek Daniel - Neurochirurgické oddělení FNM

Školitel: doc. MUDr. Karel Šonka, DrSc. - Neurologická klinika 1. LF a VFN

■ **Klíčová slova:** tumor zadní jámy, obstrukční hydrocefalus, VP shunt, děti.

Autoři se zabývali faktory, potenciálně ovlivňujícími vznik a vývoj obstrukčního hydrocefalu u nemocných s nádorem v zadní jámě lební v dětském věku.

Na neurochirurgickém oddělení FNM v období od 1.ledna 1997 do 31.12.2001 podstoupilo 59 pacientů neurochirurgický výkon pro nález expanzivního procesu v zadní jámě lební. Pacienti bez radiologických známek hydrocefalu byli ze studie vyloučeni.

Zbývajícím 39 pacientům (66%) byla na základě radiologického nálezu zavedena předoperačně zevní drenáž. Zevní komorová drenáž byla dle výdeje a tolerování uzavření systému nemocným na konci prvního pooperačního týdne zrušena (11 nemocných, 19%) nebo byl nemocným zaveden VP zkrat (28 nemocných, 47%).

Mezi sledovanými parametry u obou skupin (věk, radikalita výkonu, typ expanze, pohlaví, délka trvání symptomů v období před výkonem) nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

■ **Závěr:** přetrvávání obstrukčního hydrocefalu u nemocných po odstranění expanze v zadní jámě nelze dle této studie ovlivnit radikalitou výkonu a časností diagnózy.

TESTING OF EXPIRATORY FLOW LIMITATION IN PRE-SCHOOL CHILDREN

Autoři: Adriana Jiříčková, Jan Šulc, Alena Dohnalová

Školitel: doc. MUDr. Otomar Kittnar, CSc. - Fyziologický ústav 1. LF

■ **Introduction:** application of negative expiratory pressure (NEP) at the mouth during tidal expiration provides a simple non-invasive method for detecting expiratory flow limitation (EFL) during spontaneous breathing.

■ **Method:** 70 children aged 3.7 ± 1.9 yrs were studied. 31 were admitted for different respiratory diseases 39 were without any respiratory disease. No differences between the groups regarding age, height and weight were found. All pts were in a good clinical condition. Children were examined in a semirecumbent position without any sedation. After minimally two consecutive tidal breaths a preset NEP of $-5 \text{ cmH}_2\text{O}$ was applied and triggered about 20-40 miliseconds from the onset of expiration. The total duration of NEP application did not exceed duration of tidal expiration. EFL was considered when tidal expiratory flow does not change with applied NEP.

■ **Results:** EFL was found in 14/31 (45%) children of RD group and in 6/39 (15%) of the NRD group. It was found a significant difference between the groups ($p = 0,006$).

■ **Conclusions:** the children with respiratory diseases exhibited EFL more frequently compared to the other group. NEP method represents a reasonable approach for EFL testing in non-cooperating children.

Supported: Res. and develop. prog. MSM - 11110000

VLIV CYKLOSPORINU A NA PRIMÁRNÍ KULTURU HEPATOCYTŮ POTKANA: KORELACE MORFOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ

Autoři: Tomáš Kučera, Nikolína Canová

Školitelé: prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc. - Ústav pro histologii a embryologii 1. LF,

prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc. - Farmakologický ústav 1. LF

■ **Úvod:** k nežádoucím účinkům imunosupresiva cyklosporinu A (CsA) patří jeho hepatotoxické působení. Experimentální studie poukazují na jím zvýšenou tvorbu volných kyslíkových radikálů a zvýšení hladiny intracytoplasmatického vápníku jako významné mechanismy toxického působení, schopné vyvolat apoptózu. Tento efekt byl prokázán v r. 2000 v primární kultuře potkaních hepatocytů. Naším cílem bylo ověřit proapoptotické působení CsA hodnocením morfologie buněk na světelně a elektronmikroskopické úrovni a porovnat je se značením apoptotických buněk Annexin-V-bio-tinem.

■ **Metodika:** primární kultury potkaních hepatocytů byly inkubovány po dobu 20 h v kultivačním mediu s CsA (50 mikromol/l). Poté byla část kultur inkubována s Annexin-V-biotinem (Immunotech, Francie) pro detekci apoptózy. Pro vizualizaci biotinylovaného annexinu byl použit Streptavidin-Alkaline phosphatase (DAKO, Dánsko) s detekcí pomocí alfa-naftylfosfát/FAST Red TR. Na kulturách barvených metodou H-E byla provedena kvantifikace změn morfologie buněk a jejich jader v rámci několika kategorií. Subcelulární změny byly hodnoceny v EM. Pro zjištění funkčního stavu buněk byla v supernatantu měřena produkce ury a aktivita ALT.

■ **Výsledky:** v tkáňových kulturách vystavených působení CsA došlo ke zvýšenému odlučování buněk od nosiče, byl zaznamenán vyšší výskyt buněk s apoptotickou morfologií a vyšší počet jader s alterovaným chromatinem. Přisedlé buňky měly vakuolizovanou cytoplasmu. Pomocí EM byl ověřen mj. nekrotický charakter většiny odlučujících se buněk. Značení buněk pomocí annexinu potvrdilo jeho schopnost vázat se na nekrotické buňky a tudíž neumožnilo kvantitativní hodnocení apoptózy. CsA snížil produkci ury a zvýšil aktivitu aminotransferáz v supernatantu.

■ **Závěr:** náš pokus prokázal toxické působení CsA v koncentraci 50 mikromol/l na primární kulturu potkaních hepatocytů, což je patrné z morfologických pozorování i z biochemických měření. Dále byla zhodnocena možnost využití Annexin V- biotinu pro detekci apoptotických buněk v kultuře, kde se ověřila nutnost diskriminace mezi nekrozou a apoptózou při užití tohoto markeru.

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA A MONITORACE PERITONITIDY

Autoři: David Melechovský, Robert Gürlich, Maruna Pavel

Školitel: doc. MUDr. Robert Gürlich, CSc. - I. chirurgická klinika 1. LF a VFN

■ Včasná diagnóza zánětu pobříšnice v počátečním stadiu s nejednoznačným klinickým vyjádřením nemusí být vždy jednoduchá. V současné době se v literatuře setkáváme s mnoha novými laboratorními ukazateli, které různou měrou popisují aktivitu zánětlivého procesu. V naší práci jsme se zaměřili na praktický význam využití cytokinů v diagnostice zánětů pobříšnice. Porovnáváme diagnostickou váhu klinického vyšetření ve srovnání s naměřenými plazmatickými koncentracemi prozánětlivých cytokinů. Domníváme se, že diagnóza sekundární peritonitidy je postavena na základě klinického vyšetření nemocného. Zvýšená hodnota PCT nebo IL-6 může tento klinický závěr podpořit. U pooperační peritonitidy nabývá na významu dynamické sledování cytokinů. Diagnóza terciární peritonitidy je určena laboratorním nálezem.

NOVÝ ANIMÁLNÍ MODEL DOWNOVA SYNDROMU: MYŠI S ČÁSTEČNOU TRISOMIÍ 17. CHROMOSOMU SELHÁVAJÍ V KOGNITIVNÍCH TESTECH V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI

Autoři: M. Ort - Laboratoř neurofyzologie paměti, Fyziologický ústav AV ČR, Psychiatrická klinika 1. LF a VFN

T. Vacík - Ústav molekulární genetiky a Centrum integrované genomiky AV ČR,

S. Gregorová - Ústav molekulární genetiky a Centrum integrované genomiky AV ČR,

J. Forejt - Ústav molekulární genetiky a Centrum integrované genomiky AV ČR and

J. Bureš - Laboratoř neurofyzologie paměti, Fyziologický ústav AV ČR

Školitelé: MUDr. Jan Bureš, DrSc. - Laboratoř neurofyzologie paměti, FgÚ AV ČR,

prof. MUDr. Petr Zvolský, DrSc. - Psychiatrická klinika 1. LF a VFN

■ Parciální trisomie myšího 16. chromozomu (Ts65Dn) se považuje za doposud nejlepší myší model Downova syndromu (DS), protože tento myší chromozom obsahuje většinu genů homologních lidskému chromozomu 21. Je známo, že Ts65Dn myši selhávají v úlohách testujících prostorovou paměť a modelujících tak kognitivní deficit u lidí trpících DS.

V naší práci ukazujeme vlastnosti námi nově připravených myší s parciální trisomií chromozomu 17 (Ts43H), která nese přibližně 20 genů homologních lidskému chromozomu 21. Behaviorální testování je součástí řady geno- i fenotypových analýz zaměřených na objasnění některých doposud ne přesně známých patogenetických mechanismů účinku trisomií.

V předkládané studii jsme testovali, zda Ts43H trisomické myši selhávají v kognitivních testech obdobně jako myši Ts65Dn, i když sady triplikovaných genů jsou rozdílné. Myši trisomici Ts43H (n = 12) a jejich netrisomicí sourozenci (n = 13) byli testováni sadou kognitivních prostorových úloh v modifikovaném Morrisově vodním bludišti. Myši se ve vodním bazénku učily hledat podvodní ostrůvek, jehož horní základna dosahovala těsně pod hladinu a jejímž nalezením pokusná plavba končila. Maximální povolená doba hledání byla omezena 1 minutou, zvířata podstoupila 4 hledání denně po dobu 7 dnů. Výkonnost kontrolních myší v hledání ostrůvku doznala během tréninku významného zlepšení (p < .01); doba potřebná k nalezení ostrůvku poklesla z počátečních 43±3 s (průměr±střední chyba průměru) v prvním tréninkovém dni na 11±3 s ve třetím dni tréninku a na této úrovni již zůstala. Jejich trisomicí sourozenci se sice také o něco zlepšili, ale jejich nejlepší dosažené časy 29±3 s byly významně horší nežli časy kontrol.

Naše výsledky nasvědčují tomu, že Ts43H trisomické myši mají kognitivní deficit podobný tomu, jenž byl popsán u myši Ts65Dn, a to i přesto, že u obou typů jsou triplikovány jiné geny. Ts43H myši, podobně jako myši Ts65Dn, tudíž představují dobré animální modely změn kognitivních funkcí u DS.

Pokusy vyhovují evropským směrnicím o pokusech se zvířaty 86/609/EEC.

Podporováno grantem GAČR 309/00/1656 a stipendiem HHMI pro J.F.

HLADINA LEPTINU V PERIOPERAČNÍM OBDOBÍ U PACIENTŮ PO BANDÁŽI ŽALUDKU

Autoři: Pařízková Jitka, Maruna Pavel - Ústav Patologické fyziologie 1. LF,

Gürlich Robert - I. chirurgická klinika 1. LF a VFN Praha,

Fraško Roman - I. chirurgická klinika 1. LF a VFN Praha,

Haluzík Martin - III. interní klinika 1. LF a VFN Praha

Školitel: doc. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc. - III. interní klinika 1. LF a VFN

■ Leptin je proteohormon produkovaný zejm. bílou tukovou tkání, podílející se na regulaci příjmu potravy. Hladina leptinu v séru je významně zvýšená u obézních pacientů a obecně u zánětlivých stavů.

Cílem studie bylo zjistit dynamiku sérového leptinu ve vztahu k reaktantům akutní fáze (TNF - alfa, IL-1, solubilní receptor pro IL-2, IL-6) v perioperačním období u extrémně obézních pacientů, u kterých byla provedena laparoskopicky bandáž žaludku.

■ **Metody:** do studie bylo zařazeno 18 obézních pacientů s obezitou 3. stupně - 10 žen a 8 mužů. Pacienti byli při přijetí zváženi a změřeni, byl vypočten BMI, všem pacientům byla odebrána krev po celonočním lačnění při příjmu před operací, a poté 24 h., 48 h., 72 h. po operaci. Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou 12 zdravých probandů.

■ **Výsledky:** zjistili jsme statisticky významnou elevaci sérového leptinu ($32,2 \pm 10,2$ ug/l) 24 h po operaci ve srovnání s hladinou sérového leptinu před operací ($18,4 \pm 4,1$ ug/l $p < 0,05$). Závislost sérové koncentrace leptinu a BMI během prvních 24h po operaci byla snížena ($r=0,74$, $p < 0,0001$ před operací, $r=0,42$, $p < 0,05$ 24 h po operaci). Hladiny leptinu za 24 a 48 h po chirurgickém výkonu se vrátily na úroveň před operací. Regresní koeficient měl nejvyšší hodnotu pro leptin a TNF-alfa 24 h po operaci ($r=0,40$, $p < 0,05$) a pro leptin a IL-6 24 h po operaci ($r=0,29$, $p < 0,05$). Nenalezli jsme významnou závislost mezi hladinou leptinu a IL-1 a mezi hladinou leptinu a koncentrací solubilního receptoru pro IL-2.

■ **Závěr:** během neinfekční stresové odpovědi představované v naší studii laparoskopickou břišní operací jsme zjistili statisticky významné zvýšení sérové koncentrace leptinu 24 h po chirurgickém výkonu a následný rychlý pokles jeho sérových hodnot 48 a 72 h po výkonu na původní hodnoty. Při srovnání dynamiky leptinu s ostatními měřenými biochemickými parametry je patrné jeho chování obdobné ostatním reaktantům akutní fáze. Významná závislost mezi sérovou hladinou leptinu a TNF-alfa podporuje možnost, že TNF-alfa by mohl být jedním z důležitých regulátorů tvorby leptinu v časném pooperačním období.

Práce byla realizována s podporou Grantu IGA MZ ČR 6868-3/2001.

ZMĚNY SÉROVÝCH KONCENTRACÍ GHRELINU U PACIENTEK S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ

Autoři: M. Rosická, M. Kršek, M. Haluzík, J. Svobodová, H. Papežová - Psychiatrická klinika 1. LF a VFN,

V. Justová, Z. Lacinová

Školitel: prof. MUDr. Josef Marek, DrSc. - III. interní klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod:** Ghrelin je nový endogenní peptid objevený v roce 1999 Kojimou et al. při pátrání po endogenním ligandu receptoru pro sekretagoga růstového hormonu. Jedná se o protein složený z 28 aminokyselin s octanoylovou modifikací na hydroxyskupině serinu v poloze 3. Ghrelin je v největší míře produkován v žaludku v buňkách, které jsou součástí endokrinního systému zažívacího traktu. Je silným stimulatorem sekrece růstového hormonu ze somatotropních buněk hypofýzy a podílí se na regulaci příjmu potravy a energetické homeostázy. Svým účinkem vede ke snížení energetického výdeje a zvýšení příjmu potravy a tím k nárůstu tělesné hmotnosti.

■ **Cíl:** v naší studii jsme sledovali změny sérových koncentrací ghrelinu ve skupině pacientek s mentální anorexií ve srovnání s kontrolní skupinou normostenických žen.

Pacienti a metody: Do studie bylo zařazeno 16 pacientek s mentální anorexií (věk $26,6 \pm 5,5$ let) a 13 normostenických žen (věk $29,2 \pm 9,6$ let). Sérové hladiny ghrelinu byly měřeny pomocí RIA kitu (Phoenix Peptides, USA). Sérové koncentrace leptinu a leptinového receptoru byly detekovány pomocí komerčního ELISA kitu (BioVendor, Česká republika, Praha).

■ **Výsledky:** u pacientek s mentální anorexií byla zjištěna signifikantně nižší hodnota body mass indexu (BMI) ($15,2 \pm 2,8$ vs. $20,7 \pm 2,2$ kg.m⁻², $p < 0,0001$) a procenta tělesného tuku ($16,3 \pm 5,7$ vs. $23,4 \pm 7,6$ %, $p < 0,01$). Ve skupině pacientek

s mentální anorexií byla zjištěna signifikantně vyšší sérová hladina ghrelinu (443.3 ± 147.0 vs. 332.1 ± 103 pg/ml, $p < 0.05$), nižší sérová hladina leptinu (2.6 ± 3.1 vs. 5.1 ± 3.8 ng.ml⁻¹, $p < 0.01$) a zvýšená sérová hladina solubilního leptinového receptoru (30.8 ± 19.0 vs. 22.1 ± 15.5 U.ml⁻¹, $p < 0.05$). Nebyla zjištěna korelace mezi sérovými hladinami ghrelinu a ostatními sledovanými parametry.

■ **Závěr:** v naší práci jsme zjistili statisticky významné zvýšení sérových koncentrací ghrelinu ve skupině pacientek s mentální anorexií. Příčinou tohoto zvýšení by mohla být chronické snížení příjmu potravy.

PŘENOS A DOPAD MUTACE MITOCHONDRIÁLNÍ DNA A3243G NA ENERGETICKÝ METABOLISMUS

Autoři: Markéta Tesařová, Hana Hansíková a Jiří Zeman

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc. - Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF a VFN

■ Mezi nejčastější onemocnění mitochondriálního energetického metabolismu s maternální dědičností v naší populaci patří MELAS syndrom způsobený mtDNA mutací tRNA^{leu}(UUR) v poloze A3243G. MtDNA mutace A3243G vede k substituci adeninu za guanin v dihydrouridinovém raménku tRNA a způsobuje změnu jejího vazebného místa pro transkripční terminační faktor. Klinické příznaky onemocnění začínají většinou ve školním věku záchvaty bolestí hlavy, křečemi, poruchami vědomí, svalovou slabostí a regrese duševního vývoje. Mezi méně časté příznaky patří diabetes mellitus II. typu a hluchota. V našem sdělení předkládáme výsledky biochemických a molekulárních vyšetření v 9 rodinách se syndromem MELAS.

■ **Materiál a metody:** MtDNA mutace A3243G byla nalezena u 25 pacientů se syndromem MELAS. Celková DNA byla izolována metodou fenolové extrakce z krve, svalové biopsie a/nebo kultivovaných fibroblastů. Celková DNA z vlasových folikulů byla uvolněna alkalickou lýzou. Přítomnost mutace A3243G a podíl mutovaných molekul mtDNA byly stanoveny denzitometricky pomocí radioaktivního PCR-RFLP. Specifické aktivity komplexů dýchacího řetězce I, II, III, IV, II+III a I+III byly stanoveny spektrofotometricky.

■ **Výsledky:** hladiny heteroplazmie (podíl mutovaných molekul mtDNA) se významně lišily nejen interindividuálně (3-65 % v krvi), ale i intraindividuálně v jednotlivých tkáních (10-87 %). Nejvyšší hladina heteroplazmie byla nalezena ve svalu. V 6 z 9 vyšetřovaných rodin s mtDNA mutací A3243G, ve kterých bylo možno vyšetřit více generací, došlo při mezigeneračním přenosu k nárůstu hladiny heteroplazmie v krvi. Pokles specifické aktivity jednoho nebo více komplexů dýchacího řetězce byl nalezen u 21 z 25 pacientů se syndromem MELAS. Nebyla nalezena významná závislost specifických aktivit komplexů dýchacího řetězce na hladině heteroplazmie mtDNA mutace A3243G.

■ **Závěr:** diagnostika mitochondriálních encefalomyopatií vyžaduje úzkou spolupráci mezi postiženými rodinami, jejich ošetřujícími lékaři a specializovanými laboratoři. U postižených pacientů je nutno kombinovat enzymatická a molekulární vyšetření v různých tkáních.

Práce vznikla s podporou projektu GAUK 4/2002/C.

VÝSKYT OSTEOPORÓZY U PACIENTŮ S ROZTROUŠENOU SKLERÓZOU MOZKOMÍŠNÍ (RS) V ZÁVISLOSTI NA MÍŘE KORTIKOTERAPIE A STUPNI HYBNÉHO POSTIŽENÍ

Autoři: Michaela Týblová, Eva Havrdová, Jan Štěpán, Vít Zikán

Školitel as. MUDr. Eva Havrdová, CSc. - Neurologická klinika 1. LF a VFN Praha

■ **Úvod:** u pacientů s RS, autoimunitním onemocněním CNS, které postihuje pacienty progredujícími hybným deficitem, pozorujeme častější výskyt osteoporózy vzhledem k věku pacientů. Onemocnění je ve svých akutních zhoršeních léčeno vysokými dávkami steroidů, řada pacientů je na dlouhodobé kombinované imunosupresi s malými dávkami cytostatik a kortikosteroidů.

■ **Metoda:** u 350 pacientů s RS bylo provedeno osteodensitometrické vyšetření. Z dokumentace pacientů byla zjištěna základní anamnestická data a vypočtena celková dávka aplikovaných kortikosteroidů v průběhu nemoci. Bylo provedeno skórování hybných funkcí pacientů (Expanded Disability Status Scale) a dotazníkové šetření se zaměřením na zjištění výskytu osteoporózy.

■ **Výsledky:** bylo vyšetřeno 59 mužů (ve věku $41,7 \pm 12,3$) a 240 žen (ve věku $44,1 \pm 10,7$), EDSS $4,6 \pm 1,9$. Celková dávka kortikosteroidů činila v průměru 27 ± 16 g. Osteoporóza, tedy úbytek kostního minerálu větší než 2,5 SD normy zdravých věkově odpovídajících kontrol, byla zjištěna u 25% pacientů. Z těchto pacientů bylo 71% žen, 29% mužů. Z pacientek s osteoporózou bylo 65% žen v menopauze. Osteopenii, tedy úbytek kostního minerálu o 1-2,5 SD jsme našli u 45% nemocných. 75% pacientů s osteoporózou mělo EDSS skóre vyšší nebo rovno 6, u pacientů s osteopenií činilo $4,42 \pm 1,97$.

Množstvím aplikovaných steroidů se nelišili tito pacienti od skupiny pacientů s osteopenií. Pouze 15% pacientů s osteoporózou bylo ještě v remitentní fázi choroby, ostatní byli ve stadiu chronické progresy RS. Remitentních pacientů s osteoporózou jsme v celém souboru našli pouze 2,7%.

■ **Závěr:** jako nejvýtežnější metoda k posouzení hodnot mineralizace skeletu se ukázala densitometrie krčku femoru s vysokou prediktivní schopností pro vyhledání pacientů ohrožených frakturami. Ve vývoji osteoporózy u pacientů s RS hraje roli nejen podané množství kortikosteroidů, ale také hybnost pacientů a hormonální změny - nejnebezpečnější je kombinace dlouhodobé steroidní terapie a menopausy.

Práce byla podporována grantem IGA MZ č. 6780-3

ASYMETRIE BAZÁLNÍCH GANGLIÍ U DĚTÍ S HYPERKINETICKOU PORUCHOU

Autoři: P. Uhlíková, I. Paclt, M. Vaněčková, J. Krásenský, T. Morcinek, Z. Seidl, J. Daneš

Školitel: as. MUDr. Ivo Paclt - Psychiatrická klinika 1. LF a VFN

■ **Souhrn:** výskyt hyperkinetických poruch kolísá od 3 do 6% dětské populace, s převahou chlapců nad dívkami v poměru 3:1. Klíčové symptomy - nepozornost, impulzivita a hyperaktivita - jsou dědičné, mohou vést ke vzniku rizikového chování a asi u jedné třetiny pacientů trvají do dospělosti. Nejpravděpodobnější příčinou poruchy jsou strukturální a funkční odchylky v prefrontostriální ose. Studie byla zaměřena na zjištění pravo-levé symetrie bazálních ganglií.

Metodou MR (magnetická rezonance) bylo vyšetřeno 13 pacientů s diagnózou hyperkinetické poruchy ve věku 6 - 11 let a 8 zdravých kontrol ve stejném věku. Byla zhotovena volumetrie vybraných bazálních ganglií (nucleus caudatus, globus pallidus, putamen). Obtažení daných struktur bylo provedeno semiautomaticky pomocí vlastního programu (Scan View) na každém jednotlivém řezu a byl spočítán celkový objem struktur. Při statistickém hodnocení výsledků byl použit index symetrie a t-test.

Nucleus caudatus vlevo byl větší u 9 pacientů z 13, u kontrolních pacientů byl statisticky významně větší vpravo ($p < 0,01$). Pro putamen nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi pravou a levou stranou, přestože vlevo byl větší u 8 pacientů z 13. Globus pallidus byl vlevo větší u všech 13 pacientů, výsledek je hodnocen jako statisticky významný ($p < 0,01$).

Vyšetření velikosti bazálních ganglií metodou MR prokázalo signifikantně vyšší výskyt reverzní levo>pravé asymetrie globus pallidus u dětí s hyperkinetickou poruchou a převažující výskyt této asymetrie u nucleus caudatus a putamen.

NEINVAZIVNÍ FUNKČNÍ DIAGNOSTIKA EXOKRINNÍ FUNKCE SLINIVKY BŘIŠNÍ

Autor: Zdislava Vaníčková

Školitel: MUDr. Petr Kocna, CSc. - Ústav klinické biochemie 1. LF a VFN

■ **Úvod:** cílem této studie bylo navrhnout neinvazivní funkční testy exokrinní funkce pankreatu a zavést jejich rutinní využívání v diagnostice nemocí slinivky břišní.

■ **Metodika:** množství pankreatické elastázy 1 (E1) ve stolici bylo stanoveno pomocí ELISA stanovení (se specifickou monoklonální protilátkou, Schebo-Tech, Německo) u 206 pacientů a zdravých kontrol. Dechový test se 13-C-značeným substrátem (13-C-MTG) byl proveden u podskupiny 25 jedinců. U testu s použitím 13-C-MTG (mixed triglycerides) jsme navrhli následující testovací protokol: pacienti vynechali případnou pankreatickou substituci 1 nebo 3 dny před vyšetřením a lačnili 12 hodin před započítáním testu. V průběhu testu byly odebírány vzorky vydechaného vzduchu v objemu asi 2 litry do speciálních hliníkových vaků, první vzorek nalačno před podáním testovací snídaně, další vzorky v hodinových intervalech po dobu 6 hodin. Testovací snídaně obsahovala 26 g (4 plátky) bezlepkového křehkého kukuřičného chleba, 20 g ztuženého rostlinného tuku, do něhož bylo vmíšeno 250 mg 13-C-MTG. Vzorky byly analyzovány pomocí přístroje Isomax-4000 (infračervený spektrofotometr, Isodiagnostika, Kanada). Pro další výpočty pomocí různých výpočetních modelů byla použita hodnota delta (postihující rozdíl poměru 13-C/12-C oxidu uhličitého v bazálním vzorku a vzorcích odebraných v průběhu testu).

■ **Výsledky:** normální hodnoty pankreatické elastázy 1 ve stolici ($> 200 \mu\text{g E1/g stolice}$) byly nalezeny u 150 jedinců, mírná pankreatická insuficience u 15 nemocných ($100-200 \mu\text{g E1/g stolice}$) a hodnoty svědčící pro těžkou pankreatickou insuficienci ($< 100 \mu\text{g E1/g stolice}$) u 41 pacientů. Hodnoty E1 nižší než $200 \mu\text{g E1/g stolice}$ dobře korespondovaly s diagnózami chronické pankreatitidy (u 46,5%), nádorů pankreatu (60,0%) a cystické fibrózy (100%).

Za normální hodnoty u dechového testu byly považovány hodnoty kumulativního výdeje za 6 hodin větší než 29% podané dávky značeného substrátu. U jednotlivých pacientů byl hodnocen kumulativní výdej podaného substrátu za 6 hodin a charakter křivky hodnot delta v čase. Čtyři z testovaných pacientů vykazovali patologické hodnoty testu, přičemž u 3 z nich byly i nízké hodnoty E1 ve stolici.

■ **Závěr:** pro běžný rutinní screening porušené exokrinní pankreatické funkce doporučujeme snadné neinvazivní stanovení pankreatické elastázy 1 ve stolici, u vybraných pacientů následně použití 13-C-MTG dechového testu, který je funkčním testem v pravém slova smyslu a může být použit k diagnostice i k následnému monitorování substituční léčby.

ZMĚNY VE VLASTNOSTECH PLAZMATICKÉ MEMBRÁNY A JEJICH VLIV NA IMPULSIVITU A DEPRESIVITU PŘI HYPOLIPIDEMICKÉ TERAPII.

Autoři: J. Vevera, Z. Fišar, T. Kvasnička, H. Papežová, I. Žukov, L. Stárková

Školitel: MUDr. H. Papežová, CSc. - Psychiatrická klinika 1. LF a VFN

■ **Souhrn:** podle Endelbergovy teorie snížení hladin cholesterolu ovlivňuje mikroviskozitu buněčných membrán, která může přispívat ke snížení funkce serotoninergního systému. Tímto mechanismem se může podílet na vzrůstu impulzivního chování a výskytu afektivních poruch. V naší práci jsme zkoumali **hypotézu** zda snížení hladin cholesterolu povede ke změnám fluidity plazmatické membrány, projevující se změnou uptake serotoninu do trombocytů.

■ **Metodika:** bylo sledováno 17 osob s hyperlipoproteinémií, kterým byl statiny snižován cholesterol. Osoby byly vyšetřeny před začátkem studie, dále 4 a 8 týdnů po nasazení léků.

K objektivizování údajů jsme použili při každém měření Hamiltonovu škálu depresivity, Eysencův IVE test, a Zeckermanovu škálu. Dále jsme při každém vyšetření odebrali vzorky krve a zkoumali uptake 5HT a fluiditu plazmatických membrán.

■ **Výsledky a závěr:** klinicky jsme během studie nezaznamenali výskyt depresivní poruchy ani změnu impulzivitu. Laboratorní výsledky nejsou ke dnešnímu datu vyhodnoceny a budou předneseny během prezentace.

VÝVOJ SYNDROMU CHRONICKÉ PÁNEVNÍ BOLESTI U INTERSTICIÁLNÍ CYSTITIDY V ZÁVISLOSTI NA HISTOLOGICKÉM NÁLEZU A TYPU LÉČBY

Autor: Libor Zámečník

Školitel: doc. MUDr. Tomáš Hanuš, CSc. - Urologická klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod:** Intersticiální cystitida (IC) je chronické zánětlivé (nebakteriální) onemocnění postihující stěnu močového měchýře histologickými a morfologickými změnami, které vyvolávají syndrom chronické pánevní bolesti. Etiologie je nejasná, diagnóza se (i přes poměrně důkladné histopatologické vyšetření) převážně opírá o klinický nález, kterým se také většinou řídí typ zvolené terapie.

■ **Metodika:** vyšetřovaný soubor obsahuje 112 pacientek ve věkovém rozmezí 15-87 let (průměr 47,5 r.) vyšetřených do konce března 2002 s pánevními bolestmi a podezřením na IC. U 84 pacientek (75%) byla na základě hodnocení klinického a histopatologického nálezu (u všech mastocyty v biopsii močového měchýře, eozinofily a ostatní zánětlivé buňky) diagnostikována IC. K objektivizaci subjektivních příznaků byl použit sestavený Dotazník bolesti. Typ terapie byl zvolen na základě klinické diagnózy: subjektivní obtíže (Dotazník bolesti), urodynamické vyšetření, endoskopický nález v močovém měchýři (glomerulace) po hydrodistenzi a histopatologické vyšetření. Pacientky byly rozděleny do 3 terapeutických skupin. Léčba byla u všech (84 pac.) zahájena perorální terapií, pacientky se „středním“ stupněm obtíží byly léčeny intravezikální terapií, „těžké“ formy byly řešeny chirurgicky. Hodnocení úspěšnosti léčby probíhalo na základě výše uvedených kritérií.

■ **Výsledky:** farmakoterapie byla úspěšná u 38 pac. (45% ze všech pac.), na intravezikální léčbu dobře zareagovalo 26 ze 36 pac. (72%) a úspěšná byla chirurgická léčba u všech 20 takto léčených pacientek. Nepotvrdili jsme závislost mezi tíží klinických obtíží a histopatologickým nálezem ani mezi nálezem histopatologickým a endoskopickým.

■ **Závěr:** diagnóza a léčba intersticiální cystitidy se opírá převážně o klinický nález. Biopsii měchýře u pacientek s pánevními bolestmi lze využít převážně k vyloučení jiné patologie.

1. místo**VYHODNOCENÍ FUNKČNÍ A BIOTRANSFORMAČNÍ KAPACITY LABORATORNÍHO JATERNÍHO MONOLAYER BIOREAKTORU**

Autor: Nikolina Canová

Školitel: prof. Dr. H. Farghali, DrSc. - Farmakologický ústav 1.LF

■ Hepatocyty (HC) v primárních tkáňových kulturách (TK) bývají metabolicky méně aktivní díky inadekvátní oxygenci a kumulaci odpadních produktů. Již několik let jsou proto na našem pracovišti využívány perfundované HC imobilizované v agarózových nitích jako prototyp jaterního bioreaktoru (BR). V současnosti jsme zrekonstruovali tzv. jaterní monolayer BR a pokusili jsme se stanovit jeho funkční a metabolickou kapacitu a výsledky porovnat s konvenčními TK. Membránový BR, ve kterém jsou HC omývány perfuzním médiem okysličeným skrze speciální, pro plyny propustnou, teflonovou fólii, byl sestaven podle nedávno publikované práce (1). Deska BR byla potažena kolagenem, osazena izolovanými potkaními HC a event. překryta druhou vrstvou kolagenu (tzv. sendvičový model). Funkční a metabolická výkonnost HC v BR byla testována v průběhu 48 hodin pomocí biosyntézy urey, vyplavování ALT, biotransformace cyklosporinu A (stanoveno HPLC) a porovnána s HC v TK. Rychlost a stupeň produkce urey v BR byla významně vyšší než v TK, vyplavování ALT z HC se v prvních 20 hodinách nezvyšovalo a koncentrace CsA v perfuzátu klesla o 80% oproti výchozí hodnotě. Při použití BR, především sendvičového modelu, jsme pozorovali větší funkční stabilitu buněk než v konvenčních TK. Protože perfundované HC si dlouhodobě uchovávají vysokou výkonnost, probíhá v současné době intenzivní výzkum zaměřený na testování různých typů jaterního BR, který by mohl být kromě farmako-toxikologických studií potenciálně využit jako bioumělý orgán určený k překlenutí období mezi nástupem jaterního selhání a spontánní regenerací či transplantací jater.

(1) Langsch A, Bader A: *Biotechnology and Bioengineering*, 2001.tuo

Podpořeno IGA MZ 5885-3, GAČR 305/00/1129, J13/98:111100002.

Podpořeno GAČR 305/00/1129, IGA MZ 5885-3, J13/98:111100002.

2. místo**EPIDEMIOLOGICKÁ SITUACE ZADNÍ POLYMORFNÍ DYSTROFIE ROHOVKY V ČESKÉ REPUBLICE**

Autoři: P. Lišková, M. Filípec

Školitel: doc. MUDr. M. Filípec, CSc. - Oční klinika 1. LF a VFN

■ **Cíl:** cílem této studie bylo zjistit prevalenci a typ dědičnosti zadní polymorfnní dystrofie rohovky (ZPD) v České republice.

■ **Metodika:** u členů rodin s výskytem ZPD jsme provedli analýzu záznamů klinických vyšetření provedených v letech 1986-2000. V rodinách se ZPD jsme prováděli aktivní šetření. Diagnóza ZPD byla stanovena na základě anamnestických údajů, vyšetření na šterbinové lampě a zrcadlové mikroskopie, kterou jsme provedli k vyloučení či potvrzení diagnózy ZPD u některých pacientů.

■ **Výsledky:** celkem bylo vyšetřeno 179 členů ze šestnácti rodin se zaznamenaným onemocněním ZPD. ZPD jsme diagnostikovali u 87 jedinců (50 žen a 37 mužů). Žádné známky ZPD nejevilo 92 členů vyšetřených rodin (50 žen a 42 mužů). Ve 31 případech se jednalo o potomky prvního řádu. Vyšetření zrcadlovou mikroskopií jsme provedli u 44 pacientů se ZPD a dále u 18 potomků prvního řádu pacientů se ZPD jako potvrzení nálezu získaného vyšetřením na šterbinové lampě. Patnáct vyšetřovaných rodin vykazuje autozomálně dominantní (AD) typ dědičnosti. U jedné rodiny nelze vyloučit autozomálně recesivní typ dědičnosti.

■ **Závěr:** diagnóza ZPD byla stanovena u 87 pacientů ze 16 rodin. 15 rodin vykazuje AD typ dědičnosti. Dvě z námi sledovaných rodin jsou vhodné k provedení vazebné analýzy. Na základě dostupných údajů v literatuře se domníváme, že se jedná o největší kontinuálně sledovaný soubor pacientů se ZPD na světě a zároveň o nejčastější rohovkovou dystrofii v České republice.

3. místo**DLOUHODOBÉ ZMĚNY POČTU NEURONŮ SYNTÉZUJÍCÍCH OXID DUSNATÝ VYVOLANÉ KAINÁTEM A CHRONICKOU HYPOXIÍ**

Autor: Petra Benešová

Školitelé: doc. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc. - Fyziologický ústav 1. LF,

prof. MUDr. Jan Betka, DrSc. - Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF a FN Motol

■ Histochemickou analýzou (NADPH-diaforáza barvením) jsme testovali vliv kainátu podaného i.p. 1 den po skončení chronické hypoxie na jednotlivé oblasti hippocampu a na primární sluchový cortex. Průkazem NADPH-diaforázy, enzymu kolokalizovaného s nitric oxide syntázou (NOS), můžeme nepřímou usuzovat na produkci oxidu dusnatého (NO).

Experimentálními zvířaty byli samci laboratorního potkana kmene Wistar vlastního chovu. Od 2. do 17. dne věku byla mláďata, společně s matkou, vystavena vlivu chronické hypoxie v hypobarické komoře v simulované výšce 7000m, vždy 8 hodin denně. 18. den, tedy 1 den po skončení působení hypoxie, byl zvířatům i.p. aplikován kainát (2,5 mg/kg). K experimentům byly použity 4 skupiny zvířat:

1. Mláďata vystavená hypoxii
2. Mláďata vystavená hypoxii, kterým byl 18. den věku aplikován kainát
3. Mláďata nevystavená hypoxii
4. Mláďata nevystavená hypoxii, kterým byl 18. den věku aplikován kainát

90. den věku, tj. v době dospělosti byla zvířata usmrčena v hluboké thiopentalové narkóze transaortální perfuzí 4% pufovaného paraformaldehydu. 40mm tlusté, na kryostatu nakrájené řezy byly obarveny na průkaz NADPH-diaforáza pozitivních neuronů. Poté byly NADPH-diaforáza pozitivní neurony kvantifikovány v jednotlivých částech hippocampu (CA 1, CA 3, hilus, dorzální a ventrální list gyrus dentatus) a v primárním sluchovém cortexu.

Z výsledků je patrné, že chronická hypoxie působící v perinatálním období snižuje počet NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v oblastech CA 1 a CA 3 v porovnání s kontrolní skupinou. V hilu, dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a ve sluchové kůře jsou rozdíly oproti kontrole nevýznamné. Kainát aplikovaný normoxickým zvířatům počet NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v oblastech CA 1, CA 3 a ve sluchovém cortexu rovněž snižuje a v hilu a dorzálním listu gyrus dentatus nemění. Kainát aplikovaný hypoxickým zvířatům počet NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v oblastech CA 1, CA 2, v hilu a ventrálním listu gyrus dentatus snižuje, v dorzálním listu gyrus dentatus a ve sluchové kůře je rozdíl oproti kontrole zanedbatelný.

Tato práce je podporována grantem UK 32/2001/C/1.LF, GAČR 305/02/1238 a MSM 1111 00001.

BEZ OCENĚNÍ:

PSYCHOBIOLOGICKÉ PROJEVY DISOCIACE

Autoři: Petr Bob, Radek Ptáček, Ivo Paclt

Školitel: prof. MUDr. Petr Zvolský, DrSc. - Psychiatrická klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod:** Disociace představuje poruchy normálních integrovaných funkcí paměti, vědomí nebo identity. Podle některých zahraničních studií má přibližně 8-15% všech psychiatrických pacientů disociativní onemocnění. Neurofyziologicky jsou tyto symptomy pravděpodobně generovány epileptickou aktivitou v temporálním laloku.

■ **Metoda:** v této studii byla použita česká verze škály disociativních zkušeností (DES) (Bob, 2000) za účelem diagnostiky disociativních symptomů (např. absorpce, amnézie, depersonalizace, derealizace) v rozsahu škály 0-100.

■ **Výsledky:** prostřednictvím DES byl realizován výzkum disociace celkem u 246 osob (z toho 104 mužů a 142 žen). Z toho 87 náhodně vybraných normálních dospělých osob s medianem DES 5,78. 75 osob s diagnózou depresivní poruchy s medianem 11,39 a 84 osob s diagnózou epilepsie s medianem 13,07. Cronbachovo alfa české verze testu pro N = 246 vyšlo 0,922.

■ **Závěr:** tyto předběžné výsledky potvrdily signifikantně vyšší výskyt disociativní symptomatologie u uvedených skupin než u normální skupiny kontrolní. Zvláště pak pacienti s vysokou mírou disociace (>25) vyžadují zvláštní terapeutickou pozornost pro častou farmakorezistenci související s posttraumatickou stresovou poruchou v důsledku expozice traumatických podnětů v minulosti. Depresivní pacienti s těmito symptomy mohou být často indikováni na antikonvulziva, zatímco u těchto pacientů s epilepsií je pozitivní indikace na antidepresiva, což v širším kontextu odpovídá komplementaritě vztahů epilepsie a deprese, kdy v případě epilepsie mohou disociativní symptomy vyjadřovat interiktální symptomatologii.

AKTIVITY KOMPLEXŮ DÝCHACÍHO ŘETĚZCE: SROVNÁNÍ POLAROGRAFICKÉ A SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY

Autoři: M. Böhm, L. Wenchich, Z. Drahotka, T. Honzik, H. Hansikova, J. Houstek a J. Zeman

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc. - Klinika dětského a dorostového lékařství a Centrum Genomiky, 1. LF a VFN

■ **Úvod:** Mitochondrie se účastní mnoha metabolických pochodů, ale jejich základní biologickou funkcí je tvorba ATP. Geneticky podmíněné i získané poruchy mitochondriálního energetického metabolismu představují heterogenní skupinu

onemocnění, jejichž diagnostika závisí na řadě biochemických i molekulárních vyšetřeních. Cílem naší studie byla snaha porovnat výsledky spektrofotometrických a polarografických analýz komplexů dýchacího řetězce v izolovaných svalových vláknech a izolovaných svalových mitochondriích u pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění.

■ **Materiál a metody:** vyšetřovaný soubor tvoří 59 pacientů od kojeneckého věku až do dospělosti, u kterých jejich ošetřující lékaři indikovali svalovou biopsii. Mezi nejčastější klinické příznaky patřily progresivní hypotonie, svalová slabost, myopatie, encefalopatie, psychomotorická retardace a progresivní externí oftalmoplegie. Spektrofotometricky jsme studovali aktivity komplexů dýchacího řetězce I, II, III a IV v izolovaných svalových mitochondriích. Polarografickou metodou s použitím substrátů, které umožňují analyzovat funkce komplexů dýchacího řetězce, jsme stanovili spotřebu kyslíku u 33 pacientů v saponiněm permeabilizovaných svalových vláknech a u 26 pacientů v izolovaných svalových mitochondriích.

■ **Výsledky:** u 36 z 59 pacientů vyšetřených spektrofotometrickou metodou a u 37 z 59 pacientů, u nichž byla použita polarografická metoda, byly nalezeny snížené aktivity jednoho nebo více komplexů dýchacího řetězce. V izolovaných svalových mitochondriích byly výsledky spektrofotometrické analýzy ve shodě s polarografickým měřením u 23 z 33 pacientů (70 %), v izolovaných svalových vláknech u 23 z 26 pacientů (88 %).

■ **Diskuze a závěr:** Polarografická metoda nabízí ve srovnání se spektrofotometrickou metodou odlišný pohled na mitochondriální funkce. Zatímco spektrofotometrická měření umožňují stanovit maximální aktivity komplexů dýchacího řetězce „in vitro“, polarografická měření analyzují aktivity komplexů dýchacího řetězce za podmínek podobným intramitochondriálním poměrům „in vivo“ a studují funkci respiračního řetězce jako celku.

Práce vznikla s podporou projektu GAUK 1/2002/c.

POOPERAČNÍ PERKUTÁNNÍ ELEKTROGASTROGRAFIE U LAPAROSKOPICKÉ BANDÁŽE ŽALUDKU, SROVNÁVACÍ STUDIE S PROKINETIKEM GANATON

Autor: Roman Fraško

Školitel: doc. MUDr. Robert Gürlich, CSc. - I. chirurgická klinika 1. LF a VFN

■ Perkutánní elektrogastrografie je technika umožňující sledování žaludeční peristaltiky neinvazivním způsobem. V tomto příspěvku autor prezentuje výsledky pooperačního sledování nástupu fyziologické gastrointestinální činnosti u nemocných podstupujících na 1. chirurgické klinice VFN a 1. LF UK laparoskopickou neadjustabilní bandáž žaludku pro morbidní obezitu.

Jsou srovnány dvě skupiny nemocných. Jedna, která v perioperačním období užívala prokinetikum Ganaton (Itopridi hydrochloridum) a druhá skupina žádné prokinetikum v perioperačním období neuvádí.

Žaludeční peristaltika byla sledována celkem ve čtyřech perioperačních dnech - jeden den před výkonem, v den operace, asi 3-4 hodiny po jejím ukončení a dále dva pooperační dny. Získané výsledky nevykazují signifikantní rozdíl v časnosti nástupu fyziologické peristaltiky v pooperačním období u této skupiny nemocných.

VLIV ATORVASTATINU NA MIKROVASKULÁRNÍ REAKTIVITU U PACIENTŮ S HYPERCHOLESTEROLÉMIÍ

Autoři: Z. Kasalová, T. Štulc, M. Prázný, M. Vrablík, J. Škrha, R. Češka

Školitel: prof. MUDr. J. Škrha, DrSc. - III. interní klinika 1. LF a VFN

■ **Cílem** naší studie bylo ověřit hypotézu, že hypercholesterolémie je spojena se snížením mikrovaskulární reaktivity (MR) a že hypolipidemická léčba povede alespoň k částečné úpravě této poruchy.

■ **Metody:** 26 pacientů s hypercholesterolémií (celkový cholesterol >7,0 mmol/l), bez klinických projevů aterosklerózy, bylo léčeno atorvastatinem v dávce 20 mg denně po dobu 8-12 týdnů. MR na kůži předloktí byla vyšetřena na začátku a na konci léčby laser-dopplerovskou metodou. Hodnoty MR před léčbou byly porovnány s kontrolní skupinou zdravých osob.

■ **Výsledky:** celkový cholesterol klesl po léčbě o 31%, LDL-cholesterol o 40%. Při hodnocení celé sledované skupiny pacientů se MR po léčbě významně nezměnila. Parametry MR byly u pacientů s hyperlipidémií již před terapií srovnatelné se skupinou zdravých kontrol (+4%, NS). Výrazné zlepšení MR (+27%, p<0,05) po léčbě atorvastatinem bylo patrné u podskupiny pacientů, kteří měli hodnoty MR před léčbou snížené; nebyla však patrná žádná souvislost mezi změnami cholesterolu a změnami MR.

■ **Závěr:** Mikrovaskulární reaktivita je ukazatelem cévních změn, které se objevují spíše v pozdějších fázích procesu aterosklerozy; není patrná souvislost mezi MR a hladinou cholesterolu. U pacientů s hypercholesterolémií bez komplikací je mikrovaskulární reaktivita srovnatelná s hodnotami u zdravých osob a terapií atorvastatinem nebyla ovlivněna. Pouze u osob se sníženou MR vedla léčba atorvastatinem již po několika týdnech k zlepšení MR; toto zlepšení bylo nezávislé na hypolipidemickém účinku léčby.

KOUŘENÍ A IDIOPATICKÉ STŘEVNÍ ZÁNĚTY

Autor: Kateřina Langrová - Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

Školitel: MUDr. Eva Králíková, CSc. - Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

■ Kouření označila Světová zdravotnická organizace za největší preventabilní příčinu předčasných úmrtí na světě. V České republice ročně umírá asi 23 000 lidí na následky kouření, tedy každé páté úmrtí je způsobeno právě tabákem.

Také gastrointestinální trakt je ovlivněn abusem tabáku a ve skupině jeho onemocnění souvisejících s kouřením nacházíme také idiopatické záněty střevní (Inflammatory bowel disease - IBD).

Hlavními představiteli této skupiny jsou dvě onemocnění: ulcerosní kolitida (ulcerative colitis - UC) a Crohnova nemoc (Crohn's disease - CD). Etiologie zůstává zatím neznámá, je ale jasné, že na vzniku se podílí jak dědičná predispozice, tak faktory zevního prostředí - nejvýznamnějším je kouření.

Vztah mezi IBD a kouřením byl poprvé popsán v roce 1976, od té doby byla této problematice věnována velká pozornost (stovky prací) a většina se shoduje v názoru, že kouření je rizikovým faktorem pro vznik CD, kdežto protektivním pro vznik UC, přičemž nejohroženější skupinou pro vznik UC jsou kuřáci, kteří přestali kouřit. Dosud však chybí literární údaje o vlivu pasivního kouření na rozvoj a průběh IBD.

Pilotní studie prováděná na gastroenterologických pracovištích v Praze zkoumá současné kuřácké návyky, kuřáckou anamnézu a expozici pasivnímu kouření u pacientů trpících IBD. Zatím bylo v souboru 31 pacientů 11 nemocných UC, 19 nemocných CD. Ve skupině nemocných CD bylo 9 (47,4%) současných kuřáků, 6 (31,6%) bývalých kuřáků a 4 (21,1%) nekuřáků. Ve skupině nemocných UC bylo 2 (18,2%) současných kuřáků, 3 (27,3%) bývalí kuřáci a 6 (54,5%) nekuřáků. Pasivnímu kouření byli vystaveni nemocní CD ve 12 (63,2%), nemocní UC ve 4 (36,4%) případech; expozice pasivnímu kouření vyjádřená kvantitativně byla průměrně 10502 cig.hod., resp. 539 cig.hod. Data získaná v této pilotní studii potvrzují uváděnou závislost mezi aktivním kouřením a vznikem IBD a naznačují, že souvislost mezi pasivním kouřením a IBD je obdobná i když s méně těsnou vazbou. Celkem bude vyšetřeno 150 - 200 pacientů.

VLIV IMOBILIZAČNÍHO STRESU NA CHOVÁNÍ POTKANŮ KMENE WISTAR V ZAŘÍZENÍ PRO "OPEN FIELD"

Autoři: Denisa Lojková, Lenka Trnečková

Školitelé: prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc. a doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc. - Farmakologický ústav 1. LF

■ Vystavení organismu stresovým podnětům (stresorům) vyvolává výrazné narušení homeostázy. U potkanů kmene Wistar jsme zjistili, že imobilizační stres vyvolal v zařízení pro pasivní vyhýbání amnestickou reakci, která byla nejsilněji vyznačena, jestliže byl stresor podán 1 hodinu před averzivním stimulem. Zajímalo nás, jak se projeví stejný typ stresoru na chování potkanů v dalším zařízení pro behaviorální studie, které netestuje paměť, ale jiné důležité behaviorální parametry úrovně excitability. Pokusy jsme provedli na samcích potkanů kmene Wistar, kterým jsme aplikovali 1 hod trvající imobilizační stres kombinovaný s ponořením do vody (21±1°C) (IMO+C60). Pokusy byly provedeny v souladu se zásadami Helsinské deklarace o zacházení se zvířaty. Pro behaviorální sledování jsme použili metodu „open field“ podle Láta. Expozice IMO+C byla ukončena 60 nebo 240 min před počátkem testu, který trval 15 min.

Našli jsme signifikantní rozdíly v chování potkanů v 5ti základních parametrech, pohybu, frekvenci přeběhu, mytí, panáčkování a doby imobility. Ve srovnání s kontrolami byly první 4 parametry výrazně utlumeny u IMO+C60/60 a u IMO+C60/240 se chování už vracelo k normě. Parametr imobility byl ovlivněn opačně než u ostatních parametrů. Statistická analýza výsledků prokázala vysoce signifikantní rozdíly jak mezi kontrolami a stresem, tak i mezi oběma stresovými skupinami zvířat. Naše výsledky odpovídají svým průběhem chování potkanů při pasivním vyhýbání, ale test v "open field" se jeví citlivějším. Nálezy rovněž jsou v dobré korelaci s nalezenými změnami v hladině plazmatického kortikosteronu. Naše nálezy ukazují na citlivé ovlivnění potkanů imobilizačním stresem a mohou mít význam jako model pro hledání intervence se stresovými stavy u člověka.

Podporováno granty IGA MZČR I-6627-3 a MSM 1111 0000 1.

KOMPLIKACE PO DISSEKCI AXILY PRO KARCINOM PRSU - RETROSPEKTIVNÍ ZHODNOCENÍ

Autor: David Pavlišta

Školitel: doc. MUDr. Markéta Dušková, CSc. - Klinika plastické chirurgie 3. LF UK a FN KV

■ **Úvod:** cílem práce je zhodnotit výskyt a typ pooperačních komplikací po radikální exenteraci axily, které mají souvislost s provedeným chirurgickým výkonem.

■ **Typ studie:** retrospektivní klinická studie.

■ **Metodika:** Byla provedena retrospektivní analýza pooperačních komplikací u 116 vybraných pacientek, které byly operovány na Gynekologicko-porodnické klinice 1.LF UK a VFN v Praze v letech 1994 - 2000 pro karcinom prsu v I a II stadiu dle FIGO. Do souboru byly zařazeny nemocné, u kterých nebyla aplikována radioterapie axily ani chemoterapie, byly po dobu nejméně 12 měsíců po operaci bez známek lokoregionální rekurence a u kterých bylo v disekátu axily nalezeno nejméně 10 lymfatických uzlin. Operace byly prováděny 9 různými operatéry. Hodnoceny byly časné (výskyt infekce, seromu, hematomu) a pozdní (otok, parestezie, ztuhlost, bolest a slabost horní končetiny) komplikace. Porovnán byl výskyt obtíží v závislosti na věku pacientek, na počtu disekovaných uzlin a rozsahu operačního výkonu na prsu. Statistická významnost jevů byla hodnocena Fisherovým exaktním testem.

■ **Výsledky:** alespoň jedna komplikace se vyskytla u 65 % pacientek. U časných komplikací (hematom, infekce, serom) není statisticky významná jejich závislost ani na věku pacientky, ani na množství odstraněných uzlin. Statisticky významný ($p < 0,05$) je výskyt infekce v závislosti na rozsahu výkonu na prsu, který pravděpodobně souvisí s velikostí rané plochy. Z pozdních komplikací (otok, parestezie, ztuhlost, bolest a slabost horní končetiny) je významná nižší bolestivost u pacientek nad 55 let ($p < 0,05$) a nižší výskyt pocitu slabosti a parestezií u pacientek s parciálním výkonem na prsu ($p < 0,05$). Větší obtíže u mladších pacientek jsou pravděpodobně způsobeny jejich vyšší každodenní fyzickou aktivitou oproti starším ženám. Vyšší počet subjektivních komplikací u pacientek po ablaci prsu je vysvětlován nejen rozsahem rané plochy, ale i psychosociálními důvody.

■ **Závěr:** Disekce axily patří mezi standardní chirurgickou léčbu karcinomu prsu. Samotný chirurgický výkon bez následné radio či chemoterapie je spojen s 65 % dlouhodobou morbiditou pacientek. Vzhledem k posunu diagnostiky karcinomu prsu do nižších stádií, je třeba hledat méně invazivní stagingovou metodu, která sníží morbiditu pacientek. Perspektivní se ukazuje metoda sentinelové uzliny.

ZMĚNY CÉVNÍHO ZÁSOBENÍ STŘEVA U IDIOPATICKÝCH ZÁNĚTLIVÝCH ONEMOCNĚNÍ STŘEV SE ZVLÁŠTNÍM ZAMĚŘENÍM NA CROHNOVU CHOROBU

Autoři: I. Rathous, D. Kachlík

Školitel: doc. MUDr. Milan Lukáš, CSc. - IV. interní klinika 1. LF a VFN

■ Práce vychází ze studia cévního zásobení normálního střeva, které probíhá v Anatomickém ústavu 3. LF UK Praha. Stejnou metodou nyní začínáme zpracovávat střevo postižené idiopatickým zánětem.

V této práci bude prezentován způsob odběru a zpracování střeva.

Dále bude prezentován první výsledek zpracování střeva postiženého Crohnovou chorobou. Bude provedeno srovnání s normálním střevem.

FUNKČNÍ A DECHOVÉ PARAMETRY U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY MOZKOMÍŠNÍ (RS) - MOŽNÝ PODÍL NA VZNIKU ÚNAVY

Autoři: Kamila Řasová, Petr Brandejský, Eva Havrdová, Jan Růžička

Školitel: as. MUDr. Eva Havrdová, CSc. - Neurologická klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod:** z literárních údajů vyplývá, že se snížené funkční a dechové parametry mohou podílet na vzniku únavy u nemocných s RS.

■ **Metoda:** u 54 nemocných v remitentním stadiu RS, kteří neměli žádné akutní respirační onemocnění, jsme hodnotili stupeň disability dle Expanded Disability Status Scale (EDSS) a únavu dle Modified Fatigue Impact Scale (MFIS). Vyšetřovali jsme dechové (metodou průtok-objem na spirometru) a funkční (metodou anaerobního prahu na bicyklovém spiroergometru) parametry, které jsme porovnávali s normami zdravé netréované populace. Ke statistické analýze jsme využili Statistical Analysis System.

■ **Výsledky:** v souboru bylo 14 mužů a 40 žen, průměrný věk byl $37,0 \pm 10,1$ let, EDSS $2,8 \pm 1,53$, délka trvání onemocnění $8,33 \pm 6,62$. Maximální funkční parametry W/kg, HR, VE/kg, MET, $VO_2/kg/ml$, BF, VTex ($p < 0,001$), O_2HR ($p < 0,05$) a spirometrické parametry PEF ($p < 0,001$) a $MEF_{75, 50, 25}$ ($p < 0,05$) byly signifikantně sníženy, zatímco hodnoty RQ, EqO_2 , $EqCO_2$, VCin, VCex, ERV, FVC, FEV_1 byly v normě. Únava se signifikantně zvyšovala v závislosti na stupni EDSS ($p < 0,05$), především s postižením mentálního a mozečkového funkčního systému, věkem ($p < 0,1$) a délkou trvání onemocnění, naopak se snižovala s relativní váhou ($p < 0,1$). Mezi únavou a některými spiroergometrickými parametry METS ($p < 0,001$), VTex, HR, $VO_2/kg/ml$, O_2HR ($p < 0,05$), W/kg, VE/kg ($p < 0,1$) jsme prokázali statisticky významnou závislost, zatímco mezi únavou a spirometrickými parametry ne.

■ **Závěr:** funkční parametry jsou již u nemocných s RS s relativně nízkým stupněm disability sníženy. Snižují se v závislosti na EDSS a délce trvání onemocnění, podílejí se na vzniku únavy. Signifikantně snížené hodnoty výdechových rychlostí, z kterých můžeme usuzovat na svalovou slabost nemocných s RS, se na vzniku únavy pravděpodobně nepodílejí.

ZMĚNA KINETICKÝCH PARAMETRŮ VYCHYTÁVÁNÍ TRIJODTHYRONINU ERYTROCITY, SEROTONINU TROMBOCYTY A FLUIDITY MEMBRÁN U PACIENTŮ S DEPRESÍ

Autor: Lucie Stárková

Školitel a spoluautor: RNDr. Zdeněk Fišar, CSc., MUDr. Ivo Paclt, CSc. - Psychiatrická klinika 1. LF a VFN

■ U pacientů s depresí byly opakovaně v různých studiích pozorovány změny vlastností buněčných membrán oproti zdravým kontrolám. Tyto změny periferních parametrů mohou být odrazem systémových změn u pacientů s depresí. Pacienti s depresivním onemocněním mají narušenou aktivitu hypotalamo - hypofyzo - thyroidální osy. Předpokládá se souvislost mezi depresí a změnou parametrů vychytávání L-T3 do erytrocytů. Vzájemné ovlivnění parametrů L-T3 a L-tryptofanu hraje roli v dynamické dostupnosti plazmatického tryptofanu. Dostupnost tryptofanu v plazmě je důležitá pro syntézu serotoninu v mozku. Trombocyty se běžně používají jako model centrální funkce serotoninu. Serotonin je transportován přes membránu specifickým přenašečem (SERT).

U depresí předpokládáme na základě mnohých studií sníženou aktivitu SERT, kterou posuzujeme na základě změny kinetických parametrů vychytávání serotoninu do trombocytů. Je pravděpodobné, že u pacientů s depresí budou kinetické parametry vychytávání do erytrocytů i trombocytů změněny. Tyto změny mohou být v důsledku změn v lipidoproteinových interakcích. Změna membránové fluidity může ovlivňovat funkci transmembránových přenašečových systémů.

Do naší studie bylo zahrnuto 18 osob s první diagnostikovanou depresí před nasazením medikace a po 1 měsíci léčby citalopramem v dávce 10 až 60 mg a 28 zdravých kontrol. Deprese byla klinicky hodnocena pomocí Hamiltonovy škály a Beckovy sebesupozovací škály pro depresi. Sledovali jsme změny kinetických parametrů (K_m a V_{max}) vychytávání trijodthyroninu erytrocyty a serotoninu trombocyty. Dále jsme u vzorků pacientů s depresí měřili fluiditu plazmatických membrán erytrocytů.

Cílem studie bylo zjistit, zda dochází ke statisticky významným změnám jednotlivých parametrů v průběhu léčby a zda mezi sebou nějakým způsobem korelují. Zajímalo nás také jaký vliv má na tyto interakce podávání antidepresiv.

ELEARNING - PODPORA VÝUKY KLINICKÝCH OPERAČNÍCH OBORŮ NA 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTĚ UK

Autoři: S. Trča, M. Špunda, Z. Krška, J. Šváb, M. Pešková

Školitelé: doc. MUDr. Z. Krška, CSc. - I. chirurgická klinika 1. LF a VFN,
doc. ing. M. Špunda, CSc. - Ústav biofyziky 1. LF

■ Na klinických ústavech lékařské fakulty je základní podmínkou praktické výuky účast studentů při vyšetřovacích a léčebných postupech. Je obtížné dosáhnout souladu mezi potřebami výuky a okamžitými možnostmi ústavů, zvláště u operačních oborů. Jedna z možností jak lépe zpřístupnit tuto oblast je využít výpočetní techniku (fakultní počítačové sítě) a moderní metody zobrazení dat. Ke spolupráci na tomto tématu jsme byli vyzváni Ústavem biofyziky 1. LF UK i na 1. chirurgické klinice VFN a 1. LF.

V současnosti probíhá výcvik v práci s digitální záznamovou technikou, seznámení se základy filmářské techniky a praktické získávání dovedností při zpracování obrazového materiálu. Vzniká základ archivu digitálních výukových videosouborů. Tyto pocházejí z prostředí operačních sálů našeho ústavu. Jsou pořizovány na videokameru formátu D8 a zpracovávají na PC se softwarem umožňující činnost filmové střížny.

Vzhledem k úzké specializaci oboru činnosti, potřebou četných okamžitých reakcí na neočekávané změny situace, považujeme za nezbytné zvládnutí techniky seznámeným odborníkem -lékařem, nikoli profesionálním kameramanem.

V našem sdělení - přednášce - budeme elektronickou formou prezentovat též první konkrétní výsledky, tedy videosekvence a možnosti těchto informačních médií v našich podmínkách.

Tato forma výuky je využitelná jak ve výuce pre- tak i postgraduální a má tedy význam i pro akreditaci pracoviště.

Záměr koresponduje se současným programem Evropské unie: Akční plán eEurope. Součástí je i iniciativa Elektronické učení (eLearning).

Výsledky budou postupně prezentovány v rámci fakulty, zpřístupněny studentům na fakultním WWW serveru. Dále lze počítat s uvolněním přístupu i pro další vybraná akademická pracoviště. Jedná se o vstupní sdělení.

OVLIVNĚNÍ EXCITABILITY MOZKU U DOSPĚLÝCH POTKANŮ VYSTAVENÝCH VÝŠKOVÉ HYPOXII

Autoři: Iveta Valkounová, Dana Marešová, Stanislav Trojan

Školitel: prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc. - Fyziologický ústav 1. LF

■ Úvod: během stárnutí organismu vznikají v mozku morfologické a funkční změny, které mohou způsobit i změnu excitability korových neuronů.

■ **Metodika:** samci potkana kmene Wistar ve věku 90 dnů a 18 měsíců byli vystaveni výškové hypoxii 7000 m v hypobarické komoře po dobu 8 hodin denně, 13x v průběhu 17 dní. Epileptické záchvaty jsme vyvolávali opakovanou (5x) nadprahovou elektrickou stimulací senzomotorické kůry 18. den pokusu.

■ **Výsledky:** nadprahová elektrická stimulace senzomotorické kůry vyvolala epileptický záchvat - korový následný výboj (KNV). Opakovanou expozicí hypobarické hypoxii se trvání záchvatů u 90 denních zvířat (proti zvířatům hypoxii nevystavovaným) nezměnilo (3,26 s vs. 3,02 s), u 18 měsíčních se zkrátilo (2,72 s vs. 1,28 s).

■ **Závěr:** snížená schopnost zpětného vstřebávání glutamátu u stárnoucích potkanů, inhibiční působení katecholaminů, jejichž hladina se během hypoxie snižuje a po jejím skončení dočasně stoupá, a změny v interakci mezi glutamátem a ostatními neurotransmitery, jako s dopaminem a s GABA, by mohly být příčinou popsané rozdílné excitability.

Práce je podporována GA UK 31/2001 a MSM 111100001.

VÍTĚZNÉ PRÁCE
3. STUDENTSKÉ VĚDECKÉ KONFERENCE
IN EXTENSO





1. místo

SUCCESSFUL ENGRAFTMENT OF DONOR CELLS DEPENDS ON TIME INTERVAL BETWEEN CYCLOPHOSPHAMIDE AND IRRADIATION IN EXPERIMENTAL MURINE MODEL OF BONE MARROW TRANSPLANTATION



Tereza Pelichovská

Autoři: Tereza Pelichovská, Luděk Šefc

Školitel: MUDr. Luděk Šefc, CSc. - Institute of Pathophysiology, Charles University in Prague - First Faculty of Medicine, Czech Republic

■ Introduction

Cyclophosphamide (CY) is frequently used in cancer chemotherapy. It is used either alone or in combination with other chemotherapeutics in treatment of solid tumors. It is also used for treatment of hematological malignancies. Together with total body irradiation (TBI), it is used in the conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). However, CY has undesirable side effects. It does not suppress only the bone marrow and the immune system but it also exerts toxic systemic effects. The main goal of using CY in treatment of hematological malignancies is to eliminate the patients leukemic hematopoiesis and to allow successful HSCT. Then detailed knowledge of CY and TBI interaction and its influence on hematopoietic tissue could allow us to minimize CY and radiation doses and thus diminish harmful effects of the treatment.

Many studies on CY action have been done on murine model. The recovery from sublethal CY damage has been studied (1). Our data showed that the regeneration curve after CY administration follows a unique pattern. Single dose of CY alters the bone marrow microenvironment in such way that it either induces or suppresses regeneration of pluripotent hematopoietic progenitors (CFU-S) depending on time after CY injection.

The radioprotective effect of CY given 1 or 3 days prior to irradiation has been described previously (2). Blacket and Botnick (3) have pointed out the importance of time interval between CY and irradiation on regeneration rate of hematopoietic progenitors. CY given before TBI enhanced engraftment of erythropoietic cells (4). All these published results led us to study the influence of different time interval between CY administration and TBI on hematopoietic recovery, especially on complete engraftment of donor cells after syngenic bone marrow transplantation.

■ Material and Methods

Animals: C57B1/6 KaThy (Ly5.2) and congenic Ly5.1 female mice 6 to 8 weeks old were used. They were housed in clean conventional animal rooms and maintained on acidified water.

Drugs: Cyclophosphamide (FARMOS, Finland) was dissolved in distilled water and injected intraperitoneally in a volume of 0,5 ml. The dose was 135 mg / kg.

Total body irradiation: ^{60}Co , 1 to 6 Gy for post-irradiation dip, 5 Gy for competitive repopulation assay, 7.5 Gy for spleen colony assay.

Progenitor test: The pluripotent hematopoietic progenitors CFU-S_{day8} were determined by the spleen colony technique (5). Pooled bone marrow samples from 3 to 5 mice were prepared. Groups of 10 recipient mice were lethally irradiated with 7.5 Gy of ^{60}Co . The cells were injected after appropriate dilution in PBS-BSA. The spleen colonies were counted after 8 days. The mean colony numbers were corrected for colony overlap as described previously (6).

[^3H]thymidine suicide assay for determination of CFU-S proliferation: The method described by Becker et al. (7) was used. Bone marrow cells were collected and incubated in the M199 medium with 10 mmol HEPES, 7.4 MBq (200 mCi) of [^3H]thymidine ($^3\text{HTdR}$) per ml, for 20 min at 37° C. The cell suspensions were washed, diluted and injected into irradiated mice to determine the CFU-S content. The fraction of CFU-S killed by $^3\text{HTdR}$ was calculated.

Competitive repopulation assay: Competitive repopulation assay according to Spangrude et al has been modified (8). Groups of five Ly5.2 mice were pretreated with CY on day 7, 5, and 2 before TBI. Control mice received only irradiation. Irradiation dose was 5 Gy. 2 hrs after the irradiation, mice were transplanted with 4×10^6 bone marrow cells from the congenic (Ly5.1) donor.

Evaluation of chimerism: % of donor hematopoiesis was measured in monthly intervals in individual mice up to period of 8 months after transplantation. Peripheral blood was obtained by retroorbital bleeding. Erythrocytes were lysed and leukocytes were stained with monoclonal antibodies against Ly5.1 and Ly5.2 antigens. The ratio of Ly5.1 (donor originated) and Ly5.2 (host originated) white blood cells was determined on Becton Dickinson FACScalibur cytometer.

Statistics: Means \pm SEM.

Results

CFU-S regeneration after CY.

CFU-S in femur were depleted by 85% after single dose of CY (135 mg/kg). There occurred rapid recruitment of CFU-S into cell cycle and regeneration to pretreatment levels between days 1 to 3 after CY. This transient recovery was followed by proliferation block of CFU-S and secondary deep decrease in numbers on days 5 to 7 after CY (Fig. 1)

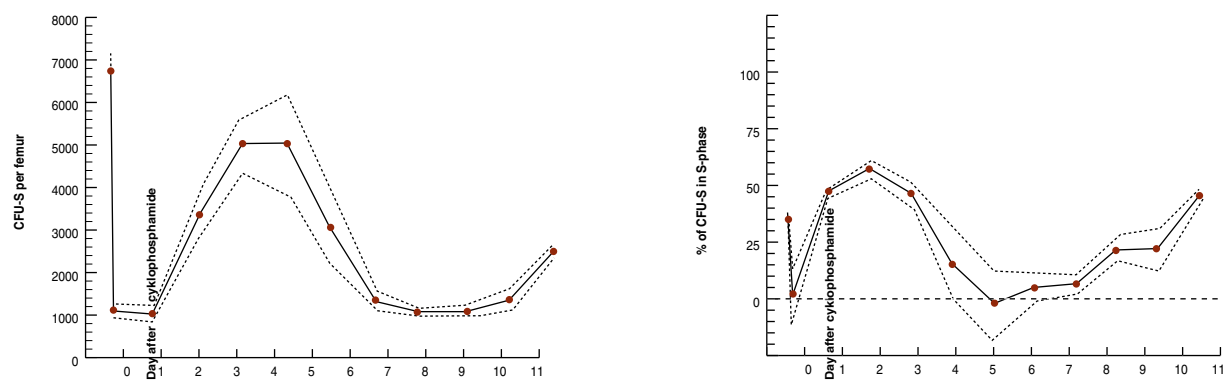


Fig.1.: CFU-S numbers and % in S-phase of cell cycle after CY administration (135 mg/kg).

Post-irradiation dip.

TBI severely depleted hematopoietic cells (D_0 for CFU-S is approx. 0.9 Gy - unpublished results). Thirty percent of progenitors that survived irradiation (1 to 6 Gy) disappeared from the bone marrow within first 24 hrs after irradiation. Only after this period ("post-irradiation dip") regeneration started. Pretreatment with CY 2 days before TBI completely abolished the dip and regeneration of CFU-S started immediately. On the other hand, CY given 7 days before TBI enhanced the post-irradiation decrease 10 times compared to control mice. (Fig. 2)

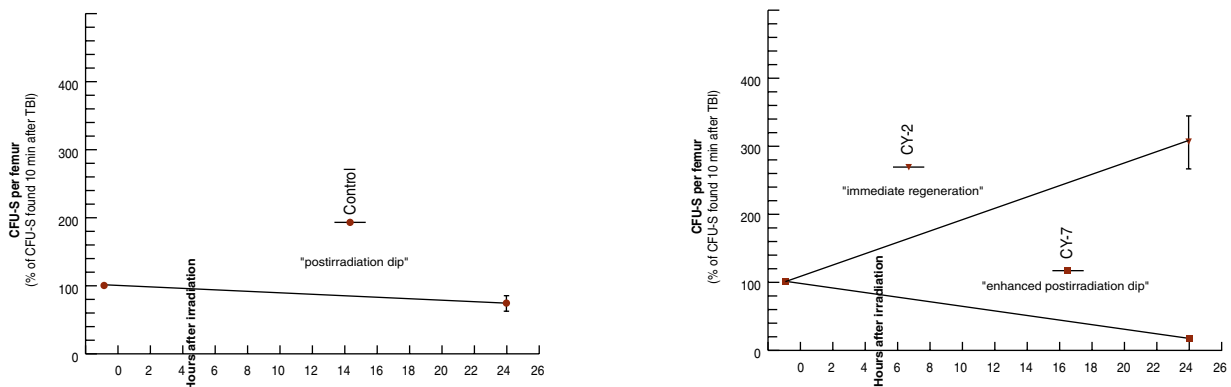


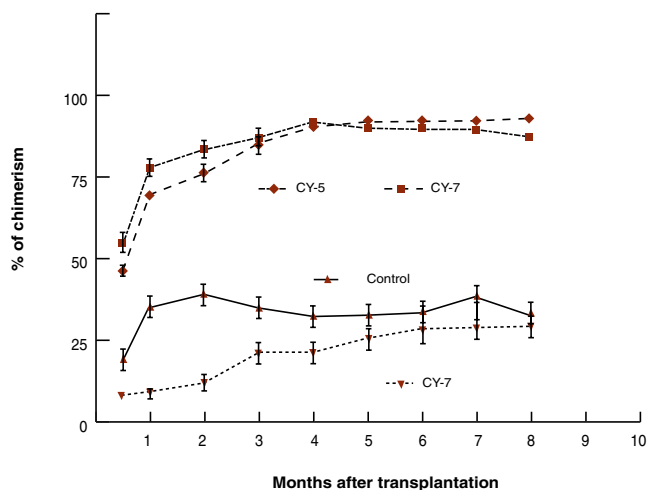
Fig. 2.: Post-irradiation decrease (dip) and/or regeneration of bone marrow CFU-S in control and CY pretreated mice during first 24 hrs after total body irradiation.

Effect of different time intervals between CY and TBI on post-transplantation chimerism.

Control mice reached 30% of donor cells in blood within the first month after the BMT and this level remained stable

for the whole period of the experiment. Pretreatment with CY 2 days prior to TBI resulted in significantly lower short-term engraftment and chimerism reached levels observed in control mice only after 3 to 4 months. Prolonged time interval (5 or 7 days) between CY and TBI led to significantly higher chimerism early after transplantation and the percentage of donor cells reached 90% after 3 to 4 months. (Figure 3)

Fig. 3.: Percentage of donor cells in mice after CY (135 mg/kg), total body irradiation (5 Gy), and bone marrow transplantation (4×10^6 bone marrow cells).



Discussion

Cyclophosphamide is a very potent alkylating agent. Toxic metabolites are cleared from the blood within 30 minutes. All later effects on hematopoiesis observed in mice are thus indirect consequences of microenvironmental changes caused by cyclophosphamide (1). Regeneration of pluripotent hematopoietic progenitors (CFU-S) follows a characteristic pattern in the bone marrow, with transient regeneration followed by a secondary deep and long lasting depression. This recovery kinetics is unique and specific for CY. The regeneration curve can be divided into two distinct phases. Early (1 to 3 days) after CY, when rapid regeneration occurs and all progenitor cells are actively dividing (% of cell in cell cycle is 50% or higher). Later (5 to 7 days) after CY, the secondary decrease of progenitors takes place and virtually no CFU-S are in S-phase.

Hematopoietic cells are one of the most sensitive cells to irradiation. As CFU-S are progenitor cells determined by a clonal assay, the cells that were detected in the bone marrow 10 min after irradiation were fully viable and functional. The further decrease within next 24 hrs (post-irradiation dip) should thus be a consequence of microenvironmental changes that do not support CFU-S recovery during this period. If irradiation was delivered 2 days after CY, when bone marrow microenvironment extensively supported proliferation and expansion of progenitor cells, the post-irradiation dip was abolished and CFU-S that survived irradiation started immediate regeneration. Controversially, irradiation 7 days after CY, when proliferation of progenitors in the bone marrow was suppressed, significantly enhanced post-irradiation dip.

Competitive repopulation assay using transplantation of cells differing in a subtype of CD45 molecule (congenic in Ly5 antigen) revealed significantly higher donor cell engraftment if time interval between CY and TBI was prolonged to 5 or 7 days compared to 2 days interval and controls without CY.

Cyclophosphamide (CY) along with total body irradiation (TBI) is often used as a conditioning regimen for human hematopoietic stem cell transplantation. The patients receive CY in 1 or multiple doses followed by after 1 or 2 days. Our experiments on mice pointed out the significance of the time interval (i.e. status of microenvironment) between CY and TBI, on the fate of progenitors in the bone marrow. We hypothesize that total body irradiation of actively regenerating bone marrow after CY will cause lower depletion of host hematopoietic stem cells and donor hematopoietic cells will be less competitive compared to only irradiated control mice. On the other hand, irradiation of bone marrow where hematopoietic microenvironment strongly inhibits hematopoiesis (5 or 7 days after CY) severely depletes host hematopoiesis, and donor hematopoietic cells can colonize bone marrow cells more effectively.

The aim of the pretransplantation patient conditioning is to eliminate the host leukemic hematopoiesis and to ensure a successful engraftment of donor stem cells. If the data of combined effects of CY and TBI on murine hematopoiesis would be proven also for human, it should be considered possible extension of the time interval between CY administration and TBI which could promote better anti-tumor effect of treatment and allow a high and stable engraftment of donor cells. Current experiments are in progress to evaluate if the same engraftment of donor cells can be achieved using lower doses of CY and/or TBI but properly timed. In addition, human cord blood hematopoietic cells were transplanted into mice with severe combined immunodeficiency (NOD-SCID mice) treated with different time combinations of CY and TBI and engraftment of human hematopoiesis will be followed up.

■ Acknowledgements

The study was supported by a grant VZ 111100003 from the Ministry of the Education. Special acknowledgements to prof. Emanuel Nečas for kind support. Also to mgr. Viktor Sýkora for analysis help. And last but not least thanks to Dana Dyrková and Dana Singerová for excellent technical help.

REFERENCES

1. L. Šeřc, O. Pšenák, V. Sýkora, K. Šulc, and E. Nečas. *Response of hematopoiesis to cyclophosphamide follows highly specific patterns in bone marrow and spleen. J Hemotherapy Stem Cell Res, accepted for publication.*
2. von der Maase H.: *Interaction of drugs and radiation in haemopoietic tissue assessed by lethality of mice after whole-body irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 48: 371-380, 1985.*
3. N. M. Blackett, L. E. Botnick: *A regulatory mechanism for the number of pluripotential haemopoietic progenitor cells in mice. Blood Cells 7: 417-426, 1981.*
4. J. D. Down, P. M. Mauch: *The effect of combining cyclophosphamide with total-body irradiation on donor bone marrow engraftment. Transplantation 51: 1309-1311, 1991.*
5. J. E. Till, E. A. McCulloch (1961) *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 14: 213.*
6. V. Znojil, E. Nečas (1988a) *The spleen colony technique. I. Correction for the overlap effect and sources of error in CFU-s determination. Cell Tissue Kinet 21: 65.*
7. A. J. Becker, E. A. McCulloch, L. Siminovitch, J. E. Till (1965) *The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice. Blood 26: 296.*
8. G. J. Spangrude, S. Heimfeld, I. L. Weissman: *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science, 241: 58-62, 1988.*



2. místo

VÝZNAM NT-3/TRK C SIGNALIZACE PRO TVORBU PACINIHO TĚLÍSEK NA BĚRCI U MYŠÍ

Autor: Jiří Šedý

Školitel: doc. MUDr. Miloš Grimm, DrSc. - Anatomický ústav 1. LF

■ Souhrn

Vývoj mechanoreceptorů je podmíněn morfogenetickými interakcemi senzitivních nervů a cílových buněk v periférii. V těchto interakcích se uplatňují neurotrofiny a neureguliny. Cílem této studie je zjistit význam neurotrofinu NT-3 a jeho trkC receptoru pro tvorbu Paciniho tělísek, která patří mezi opouzdřené, rychle se adaptující mechanoreceptory. Na membrana interossea cruris a přilehlé ploše distálního konce fibuly se konstantně vyskytuje skupina těchto tělísek. Jsou inervovány z n. interosseus dorsalis a jejich počet je dobře stanovitelný.

Ke studiu byly použity novorozenci mutantních kmenů myši s inaktivovaným genem NT-3 (Farinas et al., 1994) a s nefunkční tyrosinkinázovou doménou trkC receptoru (Klein et al., 1994). Byly analyzovány homozygoti, heterozygoti i wild type. Tělíska byla znázorňována po mikropreparaci in situ průkazem acetylcholinesterázy (Karnovsky, Roots 1964) modifikovanou přidáním Tritonu X-100 do inkubačního media. Stanovení počtu Paciniho tělísek ukázalo, že u trkC mutantních myši se tvoří o 10,05 % méně Paciniho tělísek a u NT-3 mutant o 37,30% méně než u kontrolních zvířat. NT-3/trkC signalizace je tedy jedním z faktorů, který ovlivňuje vývoj Paciniho tělísek.

Klíčová slova: Paciniho tělíska - vývoj - NT-3 - trkC - myš

■ Úvod

Paciniho, nebo též Vater-Paciniho tělíska jsou jedním z rychle se adaptujících opouzdřených mechanoreceptorů. Registrují vibrace v rozsahu 20 - 1500 Hz s maximem okolo 200 - 400 Hz. Jsou inervovány aferentním I β nervovým vláknem, které je obklopeno vnitřním sloupcem, složeným ze Schwannových buněk. Vnitřní sloupec obklopuje několik vrstev lamel a zevní vazivový obal (Iggo, Andres, 1982). Paciniho tělíska leží v podkoží, v kloubních pouzdrech, na ligamentech, periostu, interosseálních membránách a také v mesenteriu. Vyvíjejí se v prenatálním období a jejich počet je druhově specifický a je konstantní pro určitou oblast (Zelená, 1994). U myši se na dorzální straně membrana interossea cruris konstantně nalézá 35 - 42 Paciniho tělísek (Nava, 1988), která inervuje n. interosseus posterior.

Vývoj Paciniho tělísek právě tak jako vývoj i dalších mechanoreceptorů je podmíněn morfogenetickými interakcemi senzitivních nervů a cílových buněk v periférii, jak dokládají denervační vývojové studie (Zelená, 1978, 1994). V těchto interakcích se uplatňují neurotrofiny a neureguliny (Lopez et al., 1998, Kopp et al., 1997).

Neurotrofiny jsou skupinou proteinů, které mají řadu trofických funkcí v dospělém i vyvíjejícím se organismu. Neurotrofiny tvořené cílovými tkáněmi podporují přežívání neuronů, které danou oblast inervují a mají vliv na zachování jejich funkce. Do rodiny neurotrofinů patří nervový růstový faktor (NGF), růstový faktor izolovaný z mozku (BDNF), neurotrofin 3 (NT-3), NT-4/5 a růstový faktor izolovaný z gliových buněk (GDNF). Všechny tyto faktory se váží na příslušné tyrosinkinázové receptory (trkA, trkB a trkC) a s nižší afinitou také na receptor p75 (Barbacid, 1994).

Na TrkC receptor, který se vyskytuje v několika isoformách (Tessarollo, 1998), se jako jediný z neurotrofinů váže neurotrofin NT-3, který se však rovněž váže na receptory trkA, trkB a p75, ale s menší afinitou.

Je známo, že Paciniho tělíska exprimují p75, trkA (Lopez et al., 1998, Vega et al., 1996), trkB (Stark, 2001) a neuregulin (Kopp et al., 1997). V předpokusech jsme zjistili, že axon inervující tělísko exprimuje také trkC receptor, a že i obaly tělíska vykazují trkC pozitivitu. Zajímalo nás proto, zda se NT-3/trkC signalizace uplatňuje za vývoje Paciniho tělísek. U NT-3 $-/-$ myši, kterým chybí proprioceptivní receptory ve svalch (svalová vřeténka a Golgiho šlachová tělíska), byla Paciniho tělíska pozorována, jejich počet však sledován nebyl (Ernfors et al., 1994). Konstantní skupina tělísek na běrci umožňuje zjistit kvantitativně zda je jejich vývoj narušen, je-li vyřazena NT-3/trkC signalizace.

■ Materiál a metody

A - Použité kmeny myši

Ke studiu exprese trkC receptoru v Paciniho těliscích a k nácviку preparace tělísek byly použity normální dospělé myši C57Bl (AnLab, Praha).

Význam NT-3/trkC signalizace pro vývoj Paciniho tělísek byl studován u dvou mutantních kmenů myši: 1. kmen s nefunkční tyrosinkinázovou doménou trkC receptoru (Klein et al., 1994) a 2. kmen s inaktivovaným genem pro NT-3 (Farinas et al., 1994). Byly použity homozygoti ($-/-$), heterozygoti ($+/-$) i wild type ($+/+$). Ve všech případech byla hodnocena tělíska z končetin novorozených myši. Končetiny NT-3 mutantního kmene nám laskavě poskytla

prof. MUDr. J. Kučera (Dept. of Neurology, Boston University School of Medicine) a končetiny *trkC* mutanty poskytl prof. Dr. M. Sieber-Blum (Dept. of Cell Biology, Neurobiology and Anatomy, Medical College of Wisconsin). Genotypizace byla provedena v jejich laboratořích.

B - *Imunohistochemické znázornění trkC receptoru v Paciniho tělíscích.*

Dolní kočetina myši usmrčených pentobarbitalem byla fixována 4% paraformaldehydem přes noc a poté byla vypreparována skupina Paciniho tělísek spolu s nervus interosseus posterior. Vypreparovaná tělíska byla vyprána v K fosfátovém pufru, prosycena sacharosou (7.5% a dále 15%), zalita do O.C.T. compound (Miles Scientific) a zmrazena v tekutém dusíku.

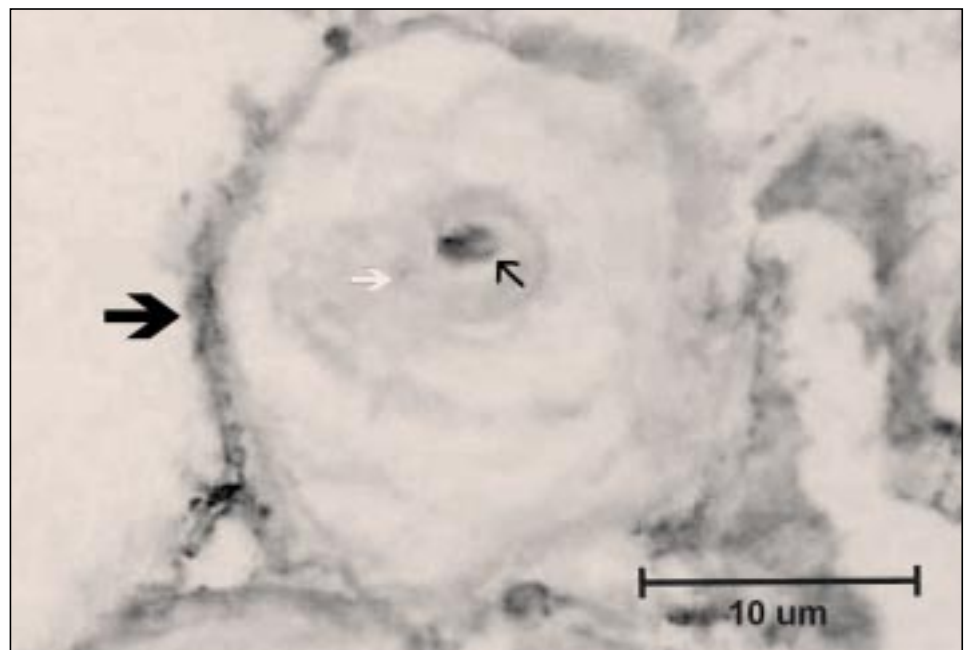
Sériové 8 μm silné kryostatové řezy byly přenášeny na silanizovaná skla. Po vyprání v PBS byla blokována endogenní peroxidáza (0.6% peroxid vodíku v metanolu) po dobu 20 minut, pak znovu prána. Následně byly řezy pre-inkubovány s 50 mM glycinem v PBS 20 minut při pokojové teplotě a pak byly inkubovány v normálním kozím séru (NGS, 1:20 v PBS s 2% BSA) po dobu 20ti minut při pokojové teplotě k redukci nespecifických vazeb. Poté byly proplachovány 3x5 min. s 0.1% BSA (Aurion BSA-CTM, pH 7.4). Anti-TrkC protilátka (rabbit IgG #sc-117, non-crossreacting with TrkA and TrkB, Santa Cruz Biotechnology) byla aplikována v ředění 1:150 v 0.1% BSA přes noc při 4°C. Následovala inkubace s goat anti-rabbit sekundární protilátkou značenou peroxidázou (ředění 1:200 v 0.1% BSA) po dobu 90 minut při pokojové teplotě. Poté byly řezy prány 6x5 minut v 0.1% BSA. Reakce byla vizualizována inkubací v 3-3' diaminobenzidinu po dobu 10 minut. Negativní kontrola byla provedena pre-absorpce primární protilátky blokujícím peptidem (200 $\mu\text{g/ml}$; #sc-117 P, Santa Cruz Biotechnology).

C - *Preparace, znázornění a počítání Paciniho tělísek*

Byly použity končetiny fixované ve 4% paraformaldehydu a prané v PBS. Byl odstraněn m. triceps surae a svaly hluboké skupiny flexorů. Při odklápění m. flexor digitorum longus byl přerušen n. interosseus posterior. Skupina tělísek na distálním konci fibuly a přilehlé membrana interossea byla ponechána in situ spolu s distální polovinou nervu. Tělíska byla znázorňována průkazem acetylcholinesterázy inkubací s acetylthiocholinjodidem přímou metodou (Karnovsky, Roots, 1964) při teplotě 37°C 8-12 hodin. Inkubační roztok byl modifikován přidáním tritonu X-100 (250 μl na 37,8 ml roztoku). Po znázornění byla tělíska kvantifikována pod preparačním mikroskopem.

■ **Výsledky**

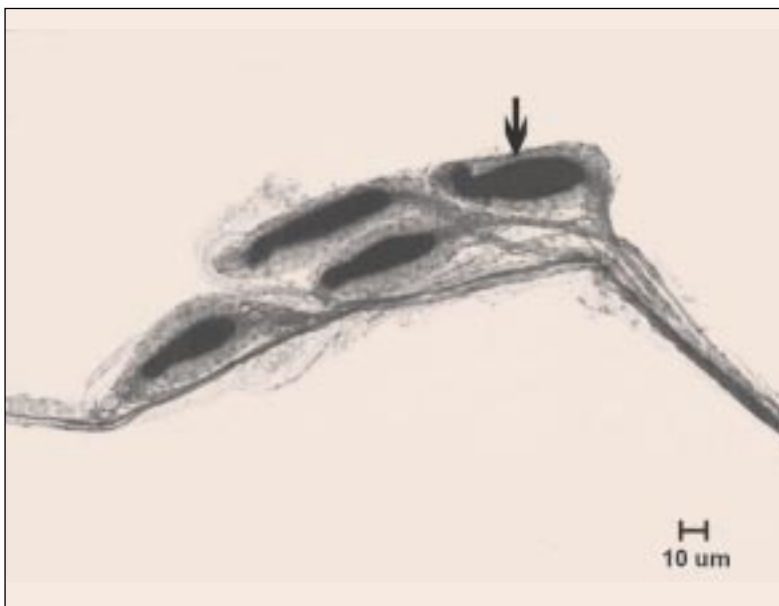
Imunohistochemická reakce s protilátkou, která se váže na *trkC* receptor ukázala pozitivitu v nervovém vláknu, ve vnitřním sloupci a slaběji také v lamelách a zevním vazivovém obalu Paciniho tělíska dospělé myši (obr. 1). Rovněž myši krátce po narození vykazují tělíska *trkC* pozitivitu v centrálním nervovém vláknu a ve vnitřním sloupci. Pozitivita v lamelách a zejména v zevním vazivovém obalu je výraznější než u dospělých zvířat.



Obr. 1.: *TrkC* pozitivita v Paciniho tělisku u kontrolní dospělé myši v axonu a vnitřním sloupci (malá černá šipka) a zevním vazivovém pouzdře (velká černá šipka). Slabá pozitivita je patrná lamelách tělíska (bílá šipka).



Obr. 2.: Pohled na dorsální stranu distální části bérce levé končetiny kontrolní dospělé myši zachycuje hlavní skupinu Paciniho tělísek, která sloužila kvantitativnímu sledování. Tělíska (silná bílá šipka) leží na periostu distálního konci fibuly (F) a přilehlé části membrana interossea cruris. Tenká bílá šipka - n. interosseus posterior.



Obr. 3.: Paciniho tělíska dospělé kontrolní myši znázorněná průkazem jejich acetylcholinesterázové aktivity. Reakční produkt je lokalizován v buňkách vnitřního sloupce (šipka) a v axonech.

Na dorsální straně bérce u myši leží podél průběhu a větvení nervus interosseus posterior 35-42 Paciniho tělísek (Nava, 1988). Detailnější popis ukazuje, že malá skupinka tělísek leží podél zpětné větvičky n. i. p. k proximálnímu úseku fibuly. Hlavní a největší skupina tělísek (obr. 2) leží na dorsální straně distálního konce fibuly a přilehlé části membrana interossea a obsahuje 23-30 tělísek s malým rozdílem průměrného počtu u dvou studovaných kmenů (tab. 1., 2.). Poslední, malá skupinka tělísek leží na tibií mediálně od hlavní skupiny. Preparace tělísek po jejich znázornění průkazem acetylcholinesterázové aktivity (obr. 3) je snadná u dospělých myši, kdežto u novorozených zvířat se nám dařilo spolehlivě vypreparovat a znázornit pouze hlavní skupinu tělísek. Zvolili jsme ji proto pro kvantitativní sledování.

U myši s afunkční tyrosinkinázovou doménou trkC receptoru je patrné signifikantní snížení počtu tělísek z 25.57 ± 0.75 tělísek u wild type, na průměrný počet 23 ± 0.65 tělísek (-10,05 %) u homozygotů. U heterozygotů byl průměrný počet tělísek 26.60 ± 0.25 (+ 4,03 %), což je nesignifikantní rozdíl oproti wild type (tab. 1).

U kmene myši s inaktivovaným genem pro NT-3 je úbytek tělísek výraznější než u předchozího kmene. U wild type jsme našli 27.83 ± 0.60 tělísek. U heterozygotů 22.00 ± 0.77 (- 20, 95 %). U homozygotů pak pouze 17.45 ± 0.21 tělísek, což představuje úbytek 37,30 % tělísek (tab. 2). Zajímavým zjištěním je vymizení středové oblasti hlavní skupiny tělísek u NT-3 knockout homozygotních myši, zatímco u trkC knockoutu ubývala tělíska difúzně (obr. 4). V místě chybějících tělísek byly patrné jen zbytky jejich vazivové složky.

■ Diskuse a závěry

Ověřili jsme, že ohraničená skupina stabilního počtu Paciniho tělísek na dorsální straně bérce u myši je vhodná ke studiu významu genů, které jsou exprimovány za vývoje nervového systému. Již dříve byly mechanoreceptory na bérce využity k elektrofyziologickým, denervačním a experimentálně embryologickým studiím u kočky (Hunt et al., 1960), laboratorního potkana (Zelená et al., 1980), bílé leghornky a japonské křepelky (Zelená et al., 1997, Grim et al., 1999). U ptáků odpovídají Paciniho tělískům tělíska Herbstova. Paciniho i Herbstova tělíska lze znázornit osmifikační nebo histochemickým průkazem jejich acetylcholinesterázové aktivity (Zelená, 1994).

Je známo, že Paciniho tělíska exprimují neurotrofinové receptory p75, trkA (Lopez et al., 1998; Vega et al., 1996), trkB (Stark, 2001) a neuregulin a jeho receptory (Kopp et al., 1997). Imunohistochemický průkaz trkC receptoru v axonu i v obalech Paciniho tělíska rozšiřuje spektrum receptorů, které jsou v tomto mechanoreceptoru exprimovány. Toto široké spektrum exprimovaných receptorů ukazuje, že se - kromě neuregulinu - ve vývoji a uchování Paciniho tělísek uplatňují více neurotrofinů. Naše studie ukázala, že k nim patří i neurotrofin NT-3. Jeho vyřazení mělo za následek úbytek 37,30% Paciniho tělísek. Vyřazení trkC receptoru se projevilo menším úbytkem tělísek, pouze o 10,05%. Tento rozdíl lze vysvětlit

Tabulka 1:

Počet Paciniho tělísek u novorozené myši s nefunkční tyrosinkinázovou doménou trkC receptoru ve srovnání s wild type.

Genotyp	Paciniho tělíska v hlavní skupině (průměr ± S.E. M.)	Změny v procentech
TrkC (+/+)	25.57 ± 0.75	100,00 %
TrkC (+/-)	26.60 ± 0.25	+4,03 %
TrkC (-/-)	23.00 ± 0.65*	-10,05 %

n = 5-8 in each group. *) signifikantně nižší vzhledem k wild type (p = 0.009) a heterozygotům (p = 0.002).

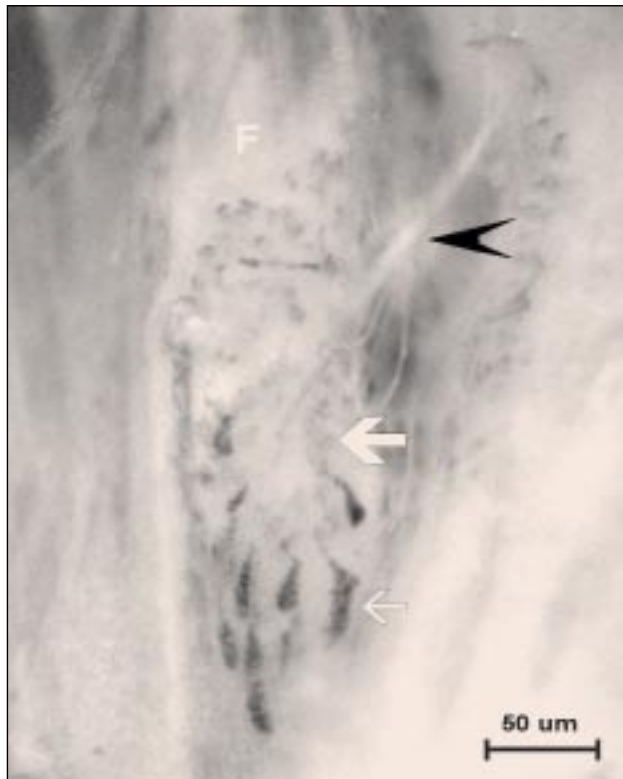
Tabulka 2: Počet Paciniho tělísek u novorozené myši s vyřazeným genem pro NT-3 ve srovnání s wild type.

Genotyp	Paciniho tělíska v hlavní skupině (průměr ± S.E. M.)	Změny v procentech
NT-3 (+/+)	27.83 ± 0.60	100,00 %
NT-3 (+/-)	22.00 ± 0.77*	-20,95 %
NT-3 (-/-)	17.45 ± 0.21**	-37,30 %

n = 5-8 in each group.

*) signifikantně nižší vzhledem k wild type (p = 0,0043)

***) signifikantně nižší vzhledem k wild type (p = 0.00016) and heterozygotům (p = 0.00046).



Obr. 4.: Skupina Paciniho tělísek na dorsální ploše fibuly (F) u novorozené NT-3 knockout homozygotní myši. V centru skupiny (velká bílá šipka) není aktivita acetylcholinesterázy patrná. Pozitivitu vykazují pouze distálně uložená tělíska (tenká bílá šipka). Černá šipka - n. interosseus posterior.

současnou afinitou NT-3 i k p75, trkA a trkB receptorům, která je však nižší, než v případě trkC receptoru.

Zjistili jsme jen částečné vymizení Paciniho tělísek. Za zachování 62,70% bérceových tělísek u NT-3 -/- mutantních myši jsou s největší pravděpodobností zodpovědné další trofické faktory. Pro jejich bližší určení, bude třeba provést kvantitativní studie počtu Paciniho tělísek po vyřazení genů kódujících jednotlivé neurotrofiny a jejich receptory. Neprovedli jsme dosud podrobnou histologickou studii, ale vymizení acetylcholinesterázové aktivity v některých těliscích u NT-3 -/- mutantních novorozených myši při současně persistujících zbytcích jejich vazivové složky naznačuje, že těliska se zpočátku tvořila, ale ještě v prenatálním období se začala rozpadat. Bylo zjištěno (Ernfors et al., 1994), že ve spinálních gangliích u NT-3 -/- novorozenců klesá počet neuronů až na 45±12% jejich obvyklého počtu. Chybějící neurony patří ke

skupině velkých neuronů, které inervují proprioceptory a také některé mechanoreceptory (Chen et al., 1999). Je proto pravděpodobné, že rozpad tělísek je způsoben ztrátou inervujících neuronů. K bližšímu objasnění významu NT-3/trkC signalizace bude dále třeba studovat produkci NT-3 v cílové tkáni, která tvoří vazivovou složku Paciniho tělíska, a která je zřejmě v určité fázi vývoje zdrojem trofických signálů pro axony neuronů vrůstajících do periferie.

LITERATURA

1. M. Barbacid: *The Trk family of neurotrophin receptors*. *J. Neurobiol.* 1994 ; 25(11), p 1386–403.
2. W. P. Chen, Y. C. Chang, S. T. Hsieh: *Trophic interactions between sensory nerves and their targets*. *J. Biomed Sci.* 1999, 6(2), p 79–85.
3. P. Ernfors., K. F. Lee, J. Kucera., R. Jaenisch: *Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents*. *Cell.* 1994, 20, 77(4), p 503–12.
4. I. Farinas., K. R. Jones, C. Backus, X. Y. Wang, L. F. Reichardt: *Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3*. *Nature.* 1994, 23, 369(6482), p 658–61.
5. M. Grim, J. Zelena, Z. Halata, P. Valasek, V. Szeder, G. Jerabkova: *Development of mechanoreceptor numbers in embryonic chick-quail chimeras*. *Anat Embryol (Berl).* 1999, 199(4), p 349–55.
6. C. C., A. K. McIntyre: *Characteristics of responses from receptors from the flexor digitorum longus muscle and the adjoining interosseous region of the cat*. *J. Physiol. (Lond.)*, 1960, 153, p 74–87.
7. A. Iggo, K. H. Andres: *Morphology of cutaneous receptors*. *Annu Rev Neurosci.* 1982, 5, p 1–31.
8. M. J. Karnovsky, L. A. Roots: *"Direct coloting" thiocholine method for cholinesterases*. *J. Histochem Cytochem.* 1964, 12, p 219–221
9. R. Klein, I. Silos-Santiago, R. J. Smeyne, S. A. Lira, R. Brambilla, S. Bryant, L. Zhang, W. D. Snider, M. Barbacid: *Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements*. *Nature.* 1994, 17, 368(6468), p 249–51.
10. D. M. Kopp, J. T. Trachtenberg, W. J. Thompson: *Glial growth factor rescues Schwann cells of mechanoreceptors from denervation-induced apoptosis*. *J. Neurosci.* 1997 1, 17(17), p 6697–706.
11. S. M. Lopez, M. Perez-Perez, J. M. Marquez, F. J. Navas, J. Represa, J. A. Vega: *p75 and TrkA neurotrophin receptors in human skin after spinal cord and peripheral nerve injury, with special reference to sensory corpuscles*. *Anat Rec.* 1998, 251(3), p 371–83.
12. P. B. Nava: *The effects of age on murine Pacinian corpuscles*. In: *Mechanoreceptors: Development, Structure and Function*. 1988. Plenum Press, New York, p 289–294.
13. B. Stark, M. Risling, T. Carlstedt: *Distribution of the neurotrophin receptors p75 and trkB in peripheral mechanoreceptors; observations on changes after injury*. *Exp Brain Res.* 2001, 136(1), p 101–7.
14. L. Tessarollo: *Pleiotropic functions of neurotrophins in development*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998, 9(2), p 125–37.
15. J. A. Vega, J. J. Haro, M. E. Del Valle: *Immunohistochemistry of human cutaneous Meissner and pacinian corpuscles*. *Microsc Res Tech.* 1996, 34(4), p 351–61.
16. J. Zelená: *The development of Pacinian corpuscles*. *J Neurocytol.* 1978, 7, p 71–91.
17. J. Zelena: *Rapid degeneration of developing rat Pacinian corpuscles after denervation*. *Brain Res.* 1980, 187(1), p 97–111.
18. J. Zelena: *Nerves and mechanoreceptors*. 1994, Chapman and Hall, London, p 144–149.
19. J. Zelena, Z. Halata, V. Szeder, M. Grim: *Crural Herbst corpuscles in chicken and quail: numbers and structure*. *Anat Embryol (Berl).* 1997, 196(4), p 323–33.



3. místo ANALÝZA MORFOLOGICKÝCH FENOTYPŮ LABORATORNÍHO POTKANA



Autorka: Václava Jeřábková Autor: David Kemlink

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc. - Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF a VFN

■ Úvod

Laboratorní potkan je již dlouho používán v biomedicínských oborech k výzkumu fyziologie a patofyziologie. Stal se preferovaným modelovým organismem pro studium genetiky mnoha komplexních chorob jako je hypertenze, non-inzulin-dependentní diabetes mellitus, choroby ledvin, autoimunitní onemocnění a poruchy chování. V současnosti je kladen velký důraz na objasňování podstaty zkoumaných jevů na úrovni DNA. Pro uspokojení těchto požadavků se v posledních letech intenzivně provádí genetické mapování nejpoužívanějších kmenů laboratorního potkana, a to jak metodou klasického vazebného genetického mapování, tak fyzického mapování (radiálních hybridů, genomových knihoven). Na tyto metody strukturální genomiky, která popisuje genom, navazují posléze metody genomiky funkční, které pomáhají odhalit funkci a interakce vytipovaných kandidátních genů. Kmen BN (Brown Norway) byl pro léta 2001 až 2003 vybrán k úplné sekvenaci a zařadí se tak spolu s *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, viry a bakteriemi do skupiny osmi geneticky nejlépe prozkoumaných organismů (1.). Tento kmen je jedním z progenitorů námi používaných linií včetně sady PXO.

V této práci je použit model genetické determinace malformačního syndromu končetin u potkana, který spočívá v souboru kongenních a rekombinantních inbredních (RI) kmenů nesoucích mutantní gen (*Lx*) pro syndrom polydaktylie-luxace (PLS). Tento model je dlouhodobě rozpracováván od záchytu malformační mutace v roce 1969 (2.). PLS je determinován genem velkého účinku *Lx*, který je lokalizován na potkaním chromozomu 8. Minimálním fenotypovým projevem této alely je preaxiální polydaktylie zadních končetin, dále se vyskytují malformace kostí stylopodia, zeugopodia i pletenců končetin. Vývoj kongenních a RI kmenů prokázal výrazný vliv modifikujících faktorů genetického pozadí na fenotypový projev determinujícího genu *Lx* (3.) i na výsledek interakce tohoto genu s teratogeny (4.).

Rekombinantní inbrední (RI) kmeny jsou dlouho široce užívány k mapování nejrůznějších mendelovskými dědičných a kvantitativních znaků. Sada rekombinantních inbredních kmenů je fixovaná F2 populace vzniklá opakovaným křížením dvou vysoce inbredních progenitorních kmenů systémem bratr x sestra (inbredizace) po více než dvacet generací. Výsledkem je soubor kmenů nesoucích různé kombinace genomů použitých progenitorních (rodičovských) kmenů v homozygotní formě, čímž je simulována populace s kontinuální distribucí kvantitativních znaků. Každý rekombinantní genom je replikovaný jako izogenní linie, díky tomu mohou být odchylky způsobené vlivy prostředí a technickými chybami minimalizovány. Jedinci jednoho kmene jsou tedy geneticky téměř identičtí a v rámci experimentu volně zaměnitelní, tedy je možné provádět studie účinků genů za různých podmínek s geneticky stejně definovaným zvířetem. Výhodou je zvýšení heritability komplexních genetických znaků a zvýšení vyhlídek na mapování vyvolávajících QTL (quantitative trait loci).

RI kmeny se používají k odhalování interakcí genomu s prostředím a pleiotropního účinku genů. Tyto důležité aspekty jsou v genetice jen těžko analyzovatelné, pokud by se používalo klasické mapování populací, v nichž je každý genom jedinečný. Další výhodou RI kmenů je, že genotypy zjištěné různými výzkumnými skupinami používajícími odlišné metody genotypizace stejných kmenů mohou být propojeny k vytvoření podrobné vazebné mapy. Užitečnost RI sad a pravděpodobnost úspěšného mapování jakéhokoli dědičného kvantitativního znaku nebo nového monogenně dědičného znaku je závislá na počtu spolehlivých a správně zařazených markerů v SDP (strain distribution pattern)(5.).

Kyselina retinová (RA) patří mezi deriváty vitamínu A - retinoidy. Jedná se o velmi významnou skupinu léčiv, používanou převážně v hematologii, onkologii hlavy, krku a mléčné žlázy jako chemoprolifaktika a v kožním lékařství, kde se podávají celkově i lokálně.

Teratogenní účinek retinové kyseliny byl popsán jako první u myši, později i u potkana a některé epidemiologické studie naznačují teratogenní účinek vitamínu A i u člověka.

Vystavení embrya nadbytku či nedostatku vitamínu A vede k poruše vývoje. Spektrum poruch způsobených jak nadměrnou, tak i nízkou nabídkou retinoidů se může dokonce překrývat, ale existují i specifické projevy nadbytku. U různých druhů se teratogenní projevy retinoidů liší a různé deriváty retinolu jsou odlišně silnými teratogeny. Na kuřecí modelu

vysoká koncentrace RA v blízkosti končetinového pupenu křídla vytváří nové ZPA (zone of polarizing activity), a způsobuje tak zrcadlovou duplikaci prstů. U ostatních druhů patří mezi projevy encefalokéla, rozštěpové vady v oblasti dutiny ústní, brachygnathie nebo oční defekty. U potkanů se nadměrné podání all-trans-RA projeví i vysokým počtem fetálních resorpcí a nálezy mrtvých plodů (embryoletalita), naopak např. 13-cis-RA je pro potkany velmi slabý teratogen. Teratogenní účinek rovněž závisí na vývojové fázi působení - při podání okolo 9. gestačního dne dominuje postižení CNS a kraniofaciální oblasti, 13. den jsou projevy maximální na končetinách a urogenitálním systému. Významnou roli také hraje podaná dávka. Nízké dávky (10 mg/kg) jsou toxické v raných fázích vývoje, pro vyvolání defektů během organogeneze jsou nutné dávky vyšší (100 mg/kg).

V organismu retinoidy interagují s mnoha transportními a regulačními proteiny, které například ovlivňují jejich distribuci (CRBP) nebo metabolismus (CRABP I a II). Cílovou strukturou jsou oblasti DNA, tzv. response elementy (RARE), na něž se RA společně se svými receptory (RAR, RXR ve formě homo- a heterodimerů) váže, a reguluje tak genovou expresi. Mezi geny, které ve svých regulačních oblastech obsahují RARE, patří mimo jiné i homeoboxové geny (u myši prokázán v *Hoxa1*, *Hoxb-1*, *Hoxd4*), které hrají klíčovou roli během vývoje končetin. Specifické kombinace *Hox* genů ovlivňují expresi cílových genů, které odpovídají za jedinečné vlastnosti diferencovaných tkání (6.).

Vyhledávání genů majících v rámci PLS vztah k působení retinové kyseliny doplňuje výzkum morfogeneze končetin (7.). Záměrem studie bylo ověřit variabilitu projevů působení RA u nové sady RI kmenů. U této sady byla provedena morfometrická analýza parametrů zadních končetin fétů, které byly vystaveny působení RA a tyto výsledky byly použity jako vstupní data pro předběžnou asociační analýzu.

■ Materiál a metody

Použité kmeny

Nová sada RI kmenů PXO vznikla za účelem studia morfogeneze končetin a analýzy účinku teratogenů (kyseliny retinové a talidomidu). Jako progenitory kmenů PXO byly zvoleny - polydaktylní, kongenní kmen SHR.*Lx* a oligodaktylní kmen BXH2. Oba nesou alelu *Lx* podmiňující syndrom polydaktylie - luxace (PLS) (2.). Tyto dva progenitorní kmeny byly vybrány pro výrazně rozdílnou expresivitu genu *Lx*, kterou kombinace genů u kmene BXH2 výrazně zvyšuje, zatímco genetické pozadí kmene SHR ji snižuje. Stejně je tomu i s modifikací citlivosti progenitorů k účinku teratogenu - kyseliny retinové (8.). PXO kmeny nově doplňují sady RI kmenů BXH a HXB, které slouží jako zvířecí modely některých lidských onemocnění (malformace končetin - PLS, esenciální hypertenze, inzulinové rezistence) (9.). Všechny PXO kmeny jsou homozygotní v alele *Lx* a nesou další různé kombinace modifikátorů původu SHR nebo BN. Společně s ostatními RI kmeny vykazují kontinuální distribuci projevů PLS.

Uspořádání farmakogenetické studie

Samice kmene SHR.*Lx* byly cíleně připouštěny a den, kdy byly ve vaginálním výtěru zjištěny spermie, byl označen 1. dnem gestace. Třináctý den gestace bylo březím samicím podáno 100 mg/kg tělesné hmotnosti kyseliny all-trans retinové (Tretinoin) v 10 ml/kg 10% roztoku etanolu v kukuřičném oleji žaludeční sondou v celkové inhalační anestézii. Kontrolním skupinám byl stejným způsobem podán pouze rozpouštěcí roztok. Dvacátý druhý den gestace (předposlední den) byly plody odebrány, zváženy a byly vyhodnoceny počty a tvar prstů zadních i předních končetin, dále byl vyhodnocen počet resorpcí v jednotlivých vrzích. Třináctý den byl zvolen pro podání RA podle předchozích pozorování, která ukázala maximální malformační účinek na zadní končetiny (7.).

Genotypizace

K sestavování SDP je používáno komerčně dostupných souborů mikrosatelitních markerů (Rat, Mit, Mgh, a další) a několika známých genů (IGF2, Lsn a další) pomocí standardního protokolu PCR (polymerase chain reaction). K vyhodnocení polymorfismu délky mikrosatelitních sekvencí (SSLP - simple sequence length polymorphism), což jsou di- až hexanukleotidové repetitivní sekvence - nejčastěji CA motivu, používáme elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu a detekci produktu po obarvení ethidium-bromidem fluorescenčně v UV světle. Výběr a pořadí markerů jsou přejímány převážně ze stávajícího SDP ostatních RI kmenů (9.), dále pak z veřejně dostupných vazebných map a z map radiačních hybridů (10., 11.). Z veřejných databázových zdrojů využíváme informace především z projektu Rat Genome Database, které jsou poskytovány na internetových stránkách rgd.mcw.edu, zdroje informatics.jax.org provozovaného ústavem The Jackson Laboratory a ratmap.gen.gu.se spravovaného společností RatMap.

Protože jedním z progenitorů PXO kmenů byl kmen ze sady BXH, který má poměr genetických pozadí BN:SHR teoreticky 1:1, je u PXO kmenů, které vznikly dalším křížením s kmenem SHR.*Lx*, tento poměr již 1:3 a v markerech, které byly u kmene BXH2 původu SHR, není u PXO přítomen polymorfismus, všechny kmeny mají tyto oblasti původu SHR. Toto „naředění“ genetického pozadí BN umožňuje snadnější vyhledávání minor genů tohoto pozadí pomocí asociační analýzy. Pro správu SDP a asociační analýzu je používán program MapManager QTX v13.

Morfometrická analýza fětů

Plody byly fixovány v 96 % etanolu a obarveny diferenciálně na chrupavku alciánovou modří a na kost alizarin-sulfátovou červení po zprůhlednění 10% roztokem hydroxidu draselného. Zadní končetiny byly analyzovány po získání digitálního obrazu pomocí scanneru s rozlišením 2400dpi pomocí systému ImageJ v1.22d dle schématu 1.

Hybridních fětů bylo od každého PXO kmene připraveno k morfologické analýze 5 až 10 od každého pohlaví.

a	Délka chrupavčité tibie	j	Distál. šířka osifikačního jádra tibie
b	Délka chrupavčité fibuly	k	Distál. šířka osifikačního jádra fibuly
c	Šířka hlavičky tibie	l	Délka osifikačního jádra femuru
d	Šířka hlavičky fibuly	m	Šířka osifikačního jádra femuru
e	Délka chrupavčitého femuru	n	Délka osifikačního jádra os. ilií
f	Délka chrupavčité pánve		Celková plocha a počet osifikačních
g	Délka osifikačního jádra tibie		jader metatarsů
h	Délka osifikačního jádra fibuly		Plocha osifikačního jádra tibie
ch	Proxim. šířka osifikačního jádra tibie		Plocha osifikačního jádra fibuly
i	Proxim. šířka osifikačního jádra fibuly		Plocha osifikačního jádra femuru

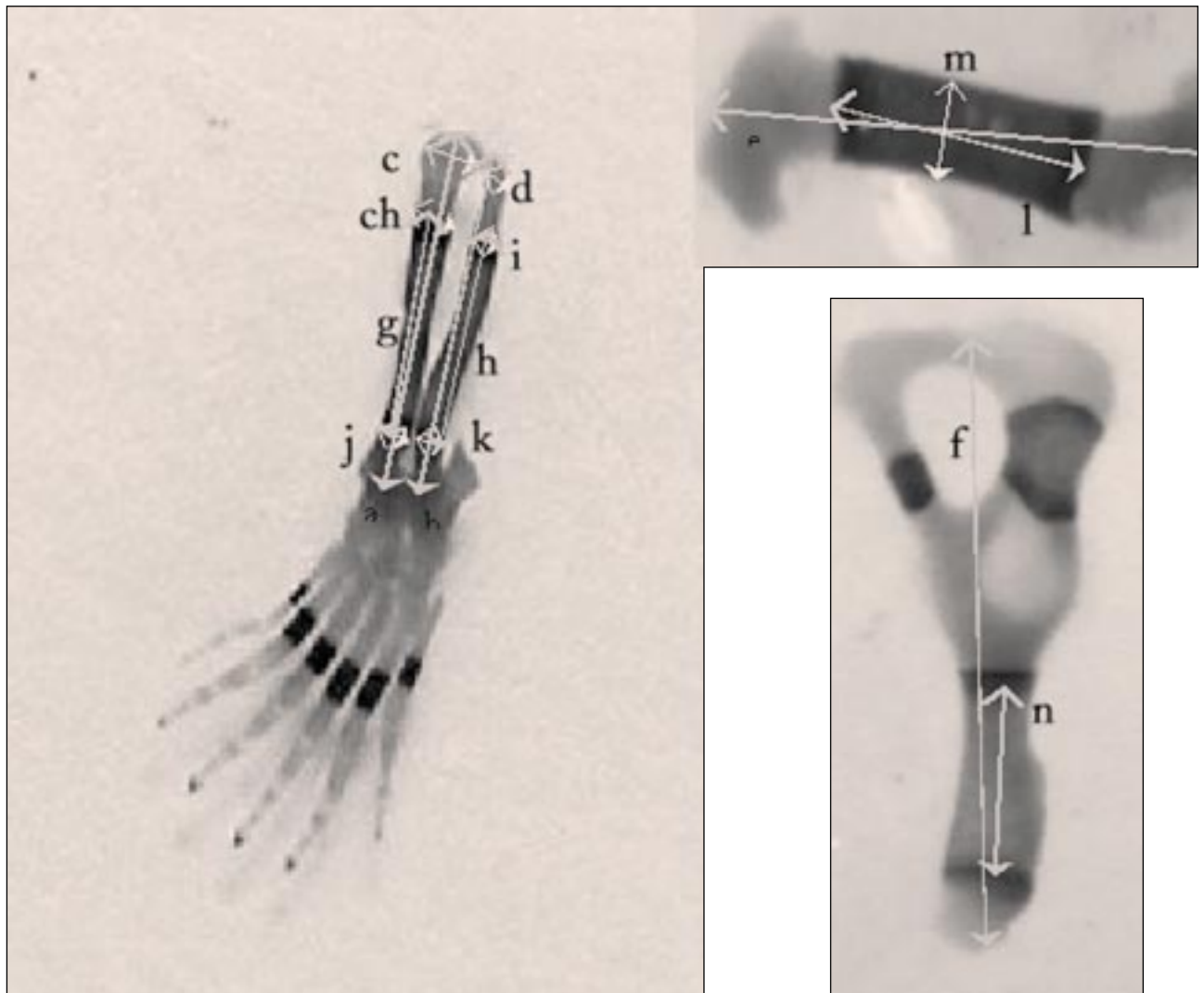


Schéma 2.:

Parametry morfometrické digitální obrazové analýzy dvojité barvených vzorků zadních končetin fětů - 22. den gestace.

Statistická analýza

Program MapManager QTX v13 (12.) byl použit pro asociční analýzu mezi vybranými fenotypovými parametry a genetickou mapou RI kmenů (včetně PXO), která má za úkol určit vazebnou polohu genů ovlivňujících fenotypové projevy alely *Lx* a také kvantifikovat míru vlivu dané oblasti na sledované parametry. Základem byly dva testy: vazebná analýza a intervalové mapování. Vazebná analýza po lineární regresní analýze vyjadřuje pravděpodobnost vazby jednotlivých genetických markerů v SDP s předpokládaným lokusem (QTL) kvantitativně ovlivňujícím hodnotu zkoumaného parametru (13.). Tento test nezohledňuje polohu jednotlivých markerů v genetické mapě. Výsledkem je pravděpodobnost vazby vyjádřená hodnotou P a LRS (likelihood ratio statistics, analogické k LOD po vydělení konstantou 4.6), dále procentuální podíl případného QTL na celkové variabilitě parametru a absolutní příspěvek k hodnotě parametru z regresní přímky. Intervalový test provádí obdobnou statistiku, ale ne pro jednotlivé markery, ale pro jednotlivé pozice na chromozomu odvozené z genetické mapy sestavené pomocí zadaného SDP, v případě RI kmenů vyjádřená pomocí Haldanovy funkce (zohledňuje možnost vícenásobných rekombinací dle Poissonova rozdělení) (14.).

■ **Výsledky***Genotypizace*

U všech PXO kmenů bylo zamapováno celkem 447 mikrosatelitních markerů, z toho polymorfních - tedy původu BN u BXH2 je 260 markerů. Původu SHR (H) u BXH2 je 187 markerů. Všechny PXO kmeny mají chromozomy 2 a 13 celé původu SHR. Je tomu tak proto, že u progenitorního kmene BXH2 jsou všechny námi analyzované lokusy na těchto chromozomech tohoto původu od progenitora SHR.*Lx* nebo SHR.

Tabulka 1.: Souhrnné údaje o aktuálním SDP PXO kmenů.

chrom.	původ u BXH2				genotypy PXO			max. inter. (cM)	délka (cM)
	markery	B	H	v RGD	B	H	F		
RNO X	6	5	1	5	21	45	0	10.27	36.48
RNO 1	51	41	10	48	230	325	2	11.73	143.59
RNO 2	47	0	47	47	0	517	0	8.15	112.48
RNO 3	29	29	0	27	193	119	2	17.68	91.49
RNO 4	36	20	16	31	88	305	3	16.10	102.24
RNO 5	25	11	14	25	51	223	1	15.76	105.66
RNO 6	23	6	17	23	40	212	0	17.25	81.77
RNO 7	29	23	6	26	110	207	1	7.91	86.23
RNO 8	9	2	7	9	15	83	1	14.88	71.86
RNO 9	17	11	6	15	55	132	0	15.14	79.52
RNO 10	57	42	15	49	281	345	1	10.28	92.77
RNO 11	12	2	10	12	10	122	0	10.29	41.63
RNO 12	7	7	0	5	34	43	0	18.76	51.79
RNO 13	13	0	13	13	0	143	0	6.77	40.78
RNO 14	12	12	0	10	92	38	1	22.21	63.96
RNO 15	9	8	1	9	38	57	0	13.71	65.40
RNO 16	12	11	1	12	72	60	0	11.25	45.50
RNO 17	9	3	6	9	24	75	0	17.27	47.56
RNO 18	15	5	10	14	21	144	0	6.58	43.25
RNO 19	22	18	4	18	120	122	0	6.87	44.92
RNO 20	7	4	3	6	22	55	0	17.74	44.63
Celkem	447	260	187	413	1517	3372	12		

Popis sloupců:

markery - počet mikrosatelitních markerů mapovaných na jednotlivých chromozomech,

původ u BXH2 - počet mikrosatelitů původu BN (B) a SHR (H) u progenitora BXH2 pro jednotlivé chromozomy,

genotypy PXO - počty genotypů původu SHR (H), BN (B) a počet heterozygotních genotypů (F),

v RGD - počet markerů, které jsou v databázi RGD,

max. inter. (cM) - největší vzdálenost dvou markerů od sebe,

délka (cM) - délka chromozomu dle pozice posledního námi mapovaného markeru.

Tabulka 1 uvádí počet chromozomálních markerů zamapovaných na jednotlivých chromozomech, počet mikrosatelitů původu BN (B) a SHR (H) u progenitora BXH2 pro jednotlivé chromozomy, markery přítomné v mapě RGD, počty genotypů původu SHR, BN a počet heterozygotních genotypů (F), maximální vzdálenosti dvou sousedních lokusů a délku chromozomu dle RGD. V poslední řádce tabulky je uvedena suma zamapovaných markerů, celkový počet markerů, které jsou původu BN a SHR u progenitora BXH2, počet markerů, které jsou přítomné v mapách RGD a celkové počty genotypů původu BN, SHR a heterozygotních u PXO kmenů.

Farmakologická studie

Po vyhodnocení nebyly u žádného z popsanych parametrů pomocí Studentova nepárového t-testu na hladině spolehlivosti 1% zjištěny signifikantní pravolevé rozdíly. Mezipohlavní rozdíly byly nalezeny pouze u délky osifikačního jádra kosti kyčelní. Tento parametr byl v asociační analýze zadán pro obě pohlaví odděleně. K asociační analýze byly mimo výsledků morfometrické analýzy zadních končetin fétů použity i dva další souhrnné parametry z hodnocení typu zadních končetin: Procento resorpcí, medián počtu prstů zadních končetin. K nalezeným markerům byly vyhledány nejbližší geny podle komparativní mapy potkana a člověka ze serveru rgd.mcw.edu. Tato takzvaná virtuální komparativní mapa je vytvořena na základě mapy radiačních hybridů potkana, která tvoří její kostru. Pomocí služby UNIGENE poskytované na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> americkou Národní lékařskou knihovnou lze vyhledat homologní sekvence k známým sekvencím. K námi nalezeným markerům byly přiřazeny geny v maximální vzdálenosti 30 cR, což odpovídá méně než 3 cM.

Pro $P < 0,001$ byly nalezeny následující asociace:

počet osifikačních jader metatarsů:

Chromozom 1 - D1Rat292 (104.96cM) $P = 0.00008$,
IGF-2 - insulinu podobný růstový faktor 2 (104.96cM) $P = 0.00060$,

délka osifikačního jádra kosti kyčelní u samíc:

Chromozom 7 - D7Rat32(11,42cM-TXNRD1 - thioredoxin reduktáza), $P = 0.00059$

medián počtu prstů zadních končetin:

Chromozom 1 - D1Mgh2(11,98cM - SGK serin/threonin kináza regulovaná glukokortioidy nebo sérem), $P = 0.00072$.

■ Závěr

V rámci sady segregovalo 260 markerů. Předpokládané zastoupení genotypů původu SHR je teoreticky 75 %, ale podle současného stavu SDP je 69,0 %. Markery jsme vybírali komplementárně ke stávajícímu SDP ostatních sad RI kmenů BXH a HXB. Díky tomu bylo možné provést asociační analýzu a vazebnou analýzu jak v samotné sadě PXO, tak i po spojení s mapou ostatních RI kmenů.

Tato teratologická studie je aplikací zvířecího modelu poruchy vývoje končetin založeného na analýze různých projevů syndromu polydaktylie-luxace u geneticky definovaných kmenů laboratorního potkana. Sada RI kmenů PXO je komplementární k existujícím sadám HXB a BXH a doplňuje je o další kombinace genetických pozadí progenitorních kmenů. U PXO kmenů byla potvrzena předchozí pozorování a byla u nich prokázána variabilita projevů PLS v kombinaci s podáním retinové kyseliny. Výsledky analýzy autopodia zadních končetin naznačují, že tento model je vhodný k další morfometrické analýze. Asociační analýza i na malém počtu kmenů naznačila oblasti genomu, kde je možné předpokládat geny malého účinku ovlivňující fenotypový projev genu velkého účinku způsobujícího poruchu vývoje končetin za současného působení silného teratogenu. Tím lze považovat tento model, včetně způsobu vyhodnocování, za vhodný ke studiu znaků kvantitativní povahy v rámci vyhledávání genů účastnících se regulace vývoje končetin.

Projekt bude pokračovat studiem vytipovaných úseků genomu, které vyplynuly z asociační analýzy. Jednou z metod bude morfometrická analýza souběžně připravovaných dvojité kongenních kmenů, které nesou kromě úseku chromozomu 8 s mutantní alelou Lx i části chromozomů s předpokládaným výskytem modifikujících QTL. Konečným cílem je indetifikace a molekulárně biologická definice příslušného genu.

1. J. H. Nadeau, (1999) *Rattus norvegicus and the Industrial Revolution. Nature Genetics* 22: 3-4 .
2. V. Křen, (1975) *Acta Univ. Carol. Med. Monograph, LXVIII*, 1975, p1-109.
3. V. Křen, et al. (1996) *Recombinant inbred and congenic strains of the rat for genetic analysis of limb morpho-genesis. Fol. Biol. (Praha)* 42: 159-166.
4. V. Bílá, V. Křen, (1996) *Teratogenic action of retinoic acid in rat congenic and recombinant inbred strains. Fol. Biol. (Praha)* 42: 167-173.
5. F. W. M. Festing, (1979) *Inbred strains in biomedical research. The Macmillan Press Ltd., London*
6. S. A. Ross, P. J. McCaffery, U. C. Drager, L. M. De Luca, (2000) *Retinoids in embryonal development, Physiol. Rev. (USA)* 80(3): 1022-1046.
7. V. Bílá, V. Křen, F. Liška, (2000) *The influence of the genetic background on the interaction of retinoic acid with Lx Mutation of the rat, Fol. Biol. (Praha)* 46:264-272.
8. V. Křen, V. Bílá, R. Kašpárek, D. Křenová, *A new net of recombinant inbred strains complementary to HXB and BXH sets. J. Exp. Anim. Sci.* 2000; 41:54-56.
9. M. Pravenec, et al. (1999) *HXB/Ipcv and BXH/Cub Recombinant inbred strains of the rat: Strain distribution patterns of 632 alleles. Fol. Biol. (Praha)* 45: 203-215.
10. T. K. Watanabe, et al. (1999) *A radiation hybrid map of the rat genom containing 5255 markers. Nat. Genet. May; 22(1): 27-36.*
11. R. G. Steen, et al. (1999) *A high density integrated genetic linkage and radiation hybrid map of the laboratory rat. Gen. Research* 9: ap 1-8.
12. K. F. Manly, J. M. Olson, (1999) *Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. Mammalian Genome* 10: 327-334.
13. C. S. Haley, S. A. Knott, (1992) *A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. Heredity* 69: 315-324
14. E. A. Carbonell, T. M. Gerig, et al. (1992). *Interval mapping in the analysis of nonadditive quantitative trait loci. Biometrics* 48: 305-315.



1. místo
CENA ZDRAVOTNICKÝCH NOVIN
HUNTINGTONOVA NEMOC:
ANALÝZA VZTAHŮ MEZI KLINICKÝMI
PROJEVY, ANAMNESTICKÝMI DATY
A VÝSLEDKY POMOCNÝCH
VYŠETŘOVACÍCH METOD



Autor: Jiří Klempíř

Školitel: doc. MUDr. Jan Roth, CSc. - Neurologická klinika 1. LF a VFN

■ **Úvod**

Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, projevující se progresivním postižením motoriky, intelektu a psychiatrickými abnormalitami. Prevalence HN je 1:20 000. Nejčastěji se manifestuje mezi 35. - 45. rokem a medián přežití se pohybuje okolo 15 - 18 let. Patologický gen je lokalizován na chromozomálním lokusu 4p16.3, kde dochází k nadměrnému zmnožení počtu (CAG)_n tripletů (>41), které dávají vznik polyglutaminové sekvenci kódující protein huntingtin. Funkce aberantního huntingtinu v patofyziologii nemoci nebyla dosud uspokojivě vysvětlena.

První klinické symptomy nemoci mohou být jak neurologické, tak psychiatrické. Demence je nejzávažnějším projevem onemocnění, vedoucím ve své plynulé a neodvratitelné progresi k naprosté nesoběstačnosti. Kauzální léčba HN dosud neexistuje. Farmakologická terapie je pouze symptomatická.

Makroskopicky je nejvýraznějším nálezem v mozku nemocných s HN relativně selektivní atrofie ncl. caudatus a putamen, v pozdějších stádiích je patrná povšechná atrofie mozku. Na CT nebo MRI je charakteristická ztráta konvexity předních rohů postranních komor a jejich balónovité rozšíření, k čemuž dochází v závislosti na atrofizaci ncl. caudatus.

Smyslem studie bylo: a. srovnat velikost caput nucleí caudati u nemocných s HN vůči zdravým kontrolám, b. analyzovat vzťahy mezi klinickými a laboratorními nálezy u nemocných HN.

■ **Soubor a metodika**

Vyšetřili jsme soubor 80 pacientů s HN potvrzenou genetickým vyšetřením (34 mužů a 46 žen). Retrospektivně z dokumentace a z informací od nemocných a rodinných příslušníků byly získány informace ohledně věku na počátku nemoci a délky trvání onemocnění, charakteru dědičnosti ve smyslu maternální či paternální heredity, charakteru iniciálních symptomů nemoci (psychiatrických nebo motorických).

Průměrný věk souboru nemocných v době vyšetřování byl 49,2 let, směrodatná odchylka (SD) 12,7 let, medián 50,5 let, modus 51 let, maximum 76 let a minimum 20 let, šikmost -0,056 a špičatost -0,35. Počátek onemocnění se manifestoval u pacientů v průměru v 42,8 letech, 12,8 medián 43 let, modus 55 let, max. 70 roků, min. 10 roků, var. rozpětí 60 let, šikmost -0,18 a špičatost -0,28. Průměrná délka nemoci byla 6,3 let, SD 4,3, medián 5 let, modus 5 let, max. 18 a min. 1 rok, var. rozpětí 17 let, šikmost 0,87 a špičatost -0,06. Věk na počátku HN vykazuje rozdělení normální, proto lze ke statistickému zpracování použít ve statistickém zpracování parametrických testů. Paternální heredita byla zjištěna u 42 pacientů (52,5%), maternální heredita byla zjištěna u 20 pacientů (25%). U 18 pacientů (22,5%) se nepodařilo zjistit, kdo z rodičů byl nositelem mutovaného genu (nová mutace, jiný biologický otec, adopce). Iniciální neurologickou symptomatiku mělo 54 pacientů (67,5%) a psychiatrickou symptomatiku 22 pacientů (27,5%). U 4 pacientů nebylo zjištěno, který z iniciálních symptomů HN se objevil jako první.

Velikost expanze CAG repetice byla stanovena analýzou DNA z leukocytů periferní krve.

CT vyšetření bylo provedeno přístrojem Place Plus firmy General Electric Medical Systems. Mimo standardní sken mozku byla vyšetřena oblast bazálních ganglií v řezech o šířce 5 mm v orbitomeatálním sklonu. U všech osob byla měřena plocha caput ncl. caudati v řezu, kde byla tato oblast shledána o největším rozsahu. Měření tohoto jádra bylo prováděno manuálně pomocí funkce kurzoru a funkcí TRACE a ROI. Aby došlo k minimalizaci odchylek v měření, byla plocha pravého i levého jádra změřena třikrát a jejich společným aritmetickým průměrem byla získána výsledná hodnota. Ve studii jsme nezohledňovali stranovou asymetrii velikosti plochy caput nucleí caudati ani eventuelní vliv pohlaví na velikost tohoto jádra.

Pro komparaci výsledků CT vyšetření mozku jsme shromáždili skupinu kontrolních osob, kterou tvořilo 43 pacientů (14 mužů a 29 žen) o průměrném věku 52,6 let, SD 14,6 let, mediánus 53 let, modus 63 let, max. 80 let, min. 19 let,

var. rozpětí 61 let, šikmost $-0,4$ a špičatost $0,24$. U těchto pacientů bylo indikováno CT vyšetření pro diagnózu cefalea či transitorní ischemická ataka a v předchorobí u nich nebylo prokázáno žádné organické postižení CNS ani neuropsychiatrické onemocnění. Podmínkou zařazení do kontrolního souboru byl zcela normální nález CT vyšetření.

■ Výsledky

Nebyl shledán rozdíl mezi souborem pacientů s Huntingtonovou nemocí a kontrolami co se věku týče (t test $0,227739$ ($p > 0,227$ $\alpha = 0,05$)). Vzájemný poměr pohlaví mezi oběma soubory ani v jednotlivých souborech není vyrovnaný. V obou sledovaných souboru převažuje počet žen nad muži a to více v souboru norem. V souboru 80 pacientů s HN bylo testováno na 34 mužů ($42,50\%$) a 46 žen ($57,50\%$). V souboru norem o celkovém počtu 43 osob bylo 14 mužů ($32,56\%$) a 29 žen ($67,44\%$).

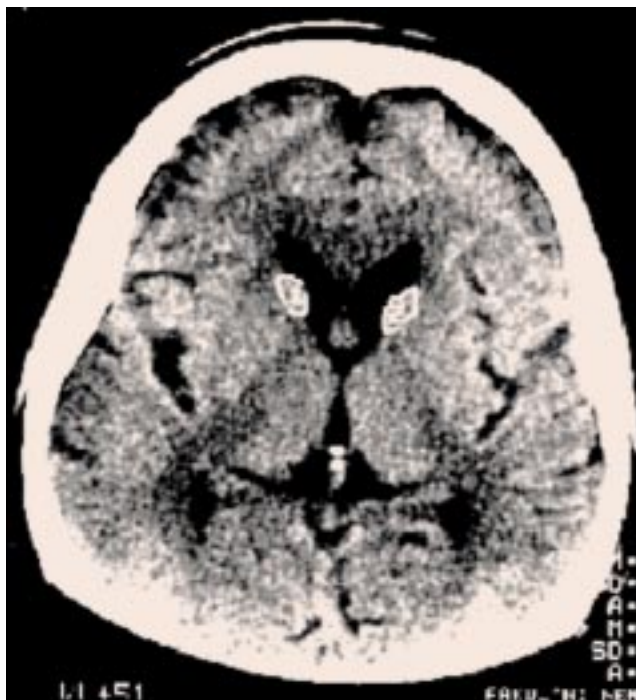
Průměrná velikost plochy caput nucleii caudati v souboru pacientů s HN byla $0,44 \text{ cm}^2$, SD $0,13 \text{ cm}^2$, medián $0,44 \text{ cm}^2$, modus $0,35 \text{ cm}^2$, min. $0,7 \text{ cm}^2$, max. $0,13 \text{ cm}^2$, var. rozpětí $0,56 \text{ cm}^2$, šikmost $-0,19$ a špičatost $-0,27$. Velikost plochy caput nucleii caudati rovněž vykazuje normální rozdělení dle hodnot šikmosti a špičatosti a potvrzuje to i Kolmogorův - Smirnovův test pro jeden výběr ($p = 0,987$).

Průměrná velikost plochy caput nucleii caudati v souboru norem byla $1,17 \text{ cm}^2$, SD $0,12 \text{ cm}^2$, medián $1,17 \text{ cm}^2$, modus $1,31 \text{ cm}^2$, max. $1,45 \text{ cm}^2$, min. $0,83 \text{ cm}^2$, var. rozpětí $0,62 \text{ cm}^2$, šikmost $-0,12$ a špičatost $0,83$ (graf č.3).

Oba soubory se ve velikosti caput nucleii caudati signifikantně liší (obr. č. 1 a 2), dle t testu $9,56287 \times 10^{-48}$ ($p < 0,001$, $\alpha = 0,01$).



Obr. č. 1.: CT planimetrie caput nucleii caudate norem.



Obr. č. 2.: CT planimetrie caput nucleii caudate osob s Huntingtonovou nemocí.

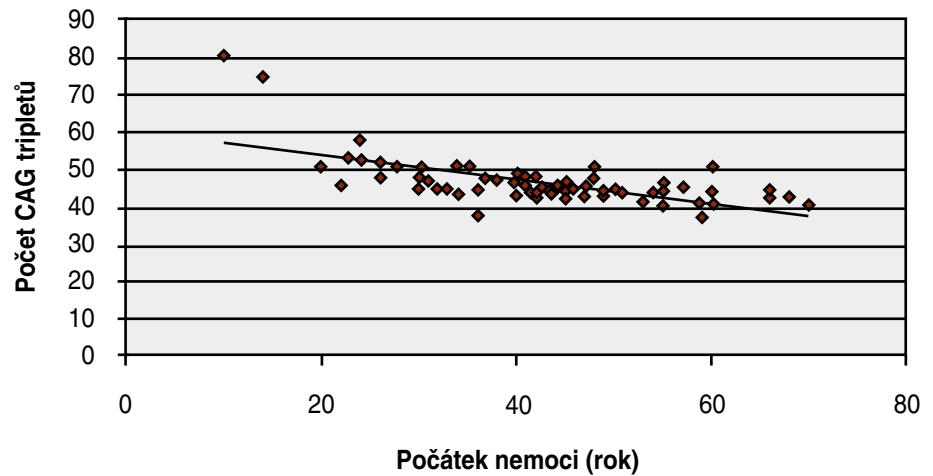
Průměrný počet $(CAG)_n$ tripletů mutovaného genu našim souborem nemocných byl $46,5$ tripletů, medián 45 , modus 45 , SD $6,25$, max. 81 , min. 38 , var. rozpětí 43 tripletů, šikmost $3,39$, špičatost $15,77$. V souboru pacientů s HN je šest osob ($7,5\%$), které mají u nichž se projevil tzv. intermediální typ dědičnosti. Jejich počet $(CAG)_n$ tripletů na chromozomálním lokusu pro HN se pohybuje v intervalu $36 - 41$ CAG tripletů (1×38 CAG, 1×40 CAG, 4×41 CAG).

Počet CAG tripletů nemá normální rozdělení, neboť má větší špičatost a velký kladný stupeň šikmosti a potvrzuje to i Kolmogorův - Smirnovův test pro jeden výběr ($p = 0,002$). Proto je nutné pro statistickou analýzu použít neparametrické testy.

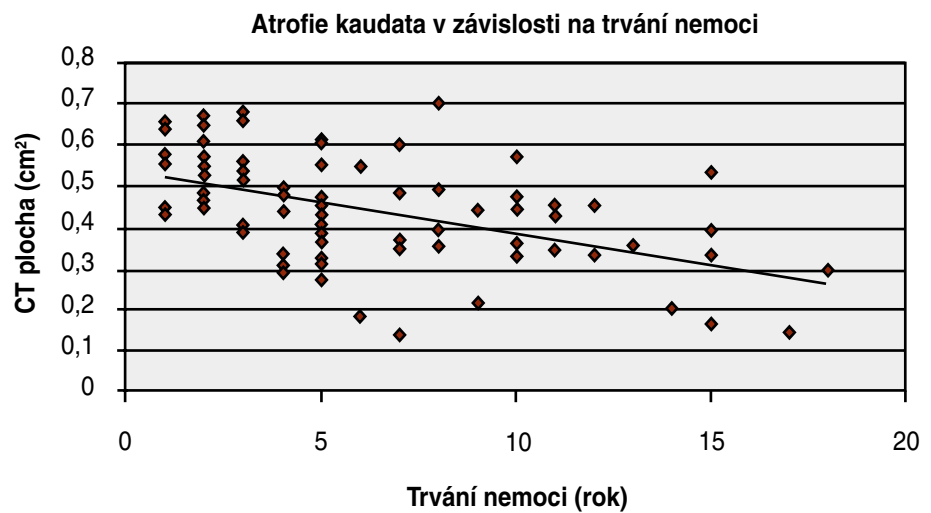
Z korelační analýzy vyplývá, že mezi počtem $(CAG)_n$ tripletů a počátkem klinických symptomů Huntingtonovou nemocí je výrazná inverzní korelace ($-0,65785$, $\alpha = 0,001$) (graf č. 1).

Z korelační analýzy vyplývá, že velikost atrofie caput nucleii caudati vykazuje signifikantní inverzní korelaci vůči délce trvání Huntingtonovy nemoci ($-0,50916$, $\alpha = 0,001$) (graf č. 2). Přírozená atrofie caput nucleii caudati u našich norem však rovněž signifikantně inverzně koreluje s věkem ($-0,36561$, $\alpha = 0,01$) (graf č. 3). Velikost plochy caput ncl. caudati v analyzovaném souboru ani u jednoho pacienta s Huntingtonovou nemocí nedosahuje nejmenší velikosti plochy caput nucleii caudati v souboru našich norem.

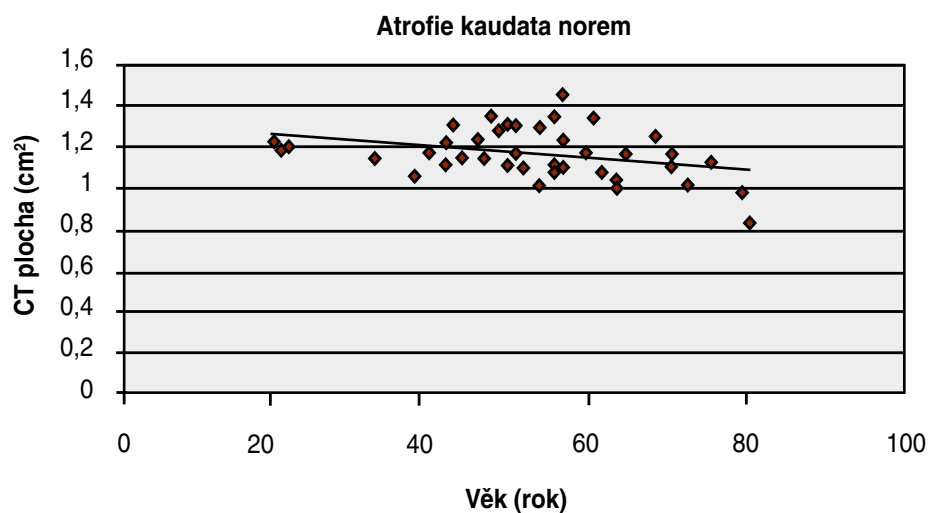
Graf. č. 1.: Inverzní korelace mezi počtem tripletů a věkem na počátku nemoci



Graf.č. 2.: Atrofie caput nucleii caudati v závislosti na délce trvání nemoci



Graf. č. 3.: Změny ve velikosti caput nucleii caudati v průběhu stárnutí u zdravých kontrol



Podle deskriptivních statistických metod a Mann - Whitneyova testu ($p = 0.422$) počet tripletů neurčuje, zda se Huntingtonova nemoc iničiálně manifestuje neurologickými či psychiatrickými symptomy. Rovněž podle deskriptivních statistických metod a Mann - Whitneyova testu ($p = 0.921$), není závislost v maternálním či paternálním přenosu na počtu CAG tripletů.

Podle testu uni-ANOVA pacienti s paternálním přenosem onemocní v průměru o 3 roky dříve než při přenosu maternálním. Tento rozdíl však není signifikantní. Platí tedy, že **věk na začátku onemocnění nezávisí na paternálním a maternálním přenosu.**

Výsledek testu uni-ANOVA rovněž ukazuje, že **onemocnění vzniká ve stejné době bez závislosti na tom zda se jsou iniciální symptomy Huntingtonovy nemoci psychiatrické či neurologické.**

■ Diskuse

Vzhledem k tomu, že ženy mají většinou menší hlavu a mozek (Reiss 1996, Nopulos 2000), tedy i nucleus caudatus, převaha žen v souboru norem tak zpřísňuje kritéria pro hodnocení rozdílů v průměrné velikosti kaudata v našem souboru mezi normami a pacienty s HN.

Data získávání pomocí počítačové tomografie jsou zatížena mnohem větším množstvím chyb. Rovněž stranová asymetrie mozkových struktur a jejich velikost v závislosti na pohlaví v CT obrazu není patrná (Raz 1996, Coffey 1998), proto jsme tyto parametry nehodnotili.

V literatuře je opakovaně zkoumána citlivost nálezu atrofie caput nuclei caudati vůči diagnóze HN. Podle našich (Roth 1996, 1999, 2000) i zahraničních poznatků (Aylwardová 2000, Halliday 1998) je plocha caput ncl. caudati citlivý marker onemocnění. Byly však publikovány i práce zpochybňující význam měření atrofických změn v této oblasti (např. Sharma 1996). Tito autoři však vycházejí z nepřímého měření atrofických změn pomocí bikaudátové, bifrontální či jiné vzdálenosti a počítáním indexů, které skutečně ani podle našich zkušeností (Roth 1996) není schopno odlišit normu od nemocného. Aylwardová (1996) našla na základě MRI vyšetření bazálních ganglií u HN korelaci mezi jejich velikostí a počátkem nemoci. Osoby s huntingtonskou mutací v presymptomatickém stádiu mají mnohem menší bazální ganglia než osoby bez mutace, kromě pallida, které zůstává nepostiženo. Věk na počátku nemoci a délka trinukleotidové sekvence signifikantně koreluje s mírou atrofie kaudata i celkovým objemem bazálních ganglií, dokonce i při opakovaném MRI vyšetření (Aylwardová 1997).

V naší studii se signifikantně lišily všechny naměřené hodnoty v souboru norem od souboru nemocných HN. Proto považujeme na základě našich výsledků záchyt atrofie caput nuclei caudati za vysoce senzitivní ukazatel nemoci. Existuje však celá řada neurologických onemocnění, která mohou klinickou neurologickou a psychiatrickou symptomatikou a atrofií caudati nuclei caudati připomínat HN (tab. č. 1).

Tab. č. 1.: Onemocnění u nichž se vyskytuje makroskopicky patrná atrofie nucleus caudatus (CD - nucleus caudatus, PUT - putamen, GP - globus pallidum, STN - nucleus subthalamicus)

Nemoc	Atrofie ncl. caudatus	Chorea	Poruchy chování	Demence
Huntingtonova nemoc	Výrazná od začátku nemoci	Ano	Ano	Ano
Dentato-rubro-palido luisianská atrofie	Někdy caput CD, hlavně GP a STN	Ano	Ano	Ano
Neuroakantocytóza	CD, PUT a GP	Ano	Ano	Ano
McLeodův syndrom	CD a PUT	Ano	Ano	Ano
AR onemocnění vázané na 4p 15.3	CD	Ano	Ano	Ano
Spinocerebellární ataxie typ 3	Mírná atrofie CD a PUT	Ano	Ne	Ne

Výskyt onemocnění výše uvedených onemocnění je kromě HN našich geografických podmínkách raritní nebo nebyl doposud zachycen.

Zřejmě existují i jiné faktory v individuální genetické výbavě než počet CAG tripletů, které s velkou pravděpodobností ovlivňují nástup nemoci, jelikož i v našem souboru nemocných HN s máme mnoho pacientů se stejným počtem CAG tripletů, ale klinický počátek nemoci je časově velmi variabilní. O nich však lze v současnosti pouze spekulovat, například deleční polymorfismus (Lucotte 1996), neuroprotektivní účinky kynurenintransferázy II (Yu 1999) a ciliárního neurotrofního faktoru (Emerich 1997), ovlivnění počátku HN u potomků familiárními faktory (Rosenblatt 2001). Nebyl pozorován vliv počtu (CAG)_n tripletů na charakter prvních symptomů (Claes 1995). Obecně platí čím větší je expanze, tím časnější je počátek nemoci a rychlejší progresse, zejména v případě juvenilních forem HN.

Instabilita počtu (CAG)_n je mnohem častější a větší při paternálním než maternálním přenosu. U mužů je rovněž větší tendence k expanzi (CAG)_n repetit (Trottier 1994). Při genetické analýze CAG tripletů pacientů s juvenilní formou HN a její heredity se v 90% zjistila paternální transmise. Vliv pohlaví na velikost expanze CAG tripletů je určována odlišným mechanismem gametogeneze. Při podrobnějším sledování expanze CAG repetit u myších samců se zjistilo, že k expanzi nedochází při mitóze ani meióze, ale v postmitotické fázi při maturaci spermatid ve spermatozoa v nadvarleti (Kremer 1995).

Vliv pohlaví na velikost expanze CAG tripletů je určována odlišným mechanismem gametóze. Při podrobnějším sledování expanze CAG repetice u myších samců se zjistilo, že k expanzi nedochází při mitóze ani meióze, ale v postmitotické fázi při maturaci spermatid ve spermatozoa v nadvarleti (Kremer 1995).

■ Závěr

1. Planimetrické měření plochy caput nuclei caudati pomocí CT u nemocných s Huntingtonovou nemocí je významným příspěvkem v diferenciální diagnostice této nemoci.
2. V průběhu nemoci dochází k lineární, progresivní atrofizaci caput nuclei caudati.
3. Čím více je přítomno u daného jedince tripletů, tím dříve se nemoc manifestuje.

LITERATURA

1. E. H. Aylward, A. M. Codori, P. E. Barta et al. Basal ganglia volume and proximity to onset in presymptomatic Huntington Disease. *Arch Neurol* 1996; 53: 1293-1296.
2. E. H. Aylward, A. M. Codori, A. Rosenblatt, M. Sherr, J. Brandt, O. C. Stine, P. E. Barta, G. D. Pearlson, *pass CA*. Rate of caudate atrophy in presymptomatic and symptomatic stages of Huntington's disease. *Mov Disord* 2000; 15(3): 552-60.
3. E. H. Aylward, Li Q, O.C. Stine et al. Longitudinal change in basal ganglia volume in patients with Huntington's disease. *Neurology* 1997; 48: 394-99.
4. S. Claes, K. Van Zand, E. Legius, R. Dom, M. Malfroid, F. Baro, J. Godderis, J. J. Cassiman (1995) Correlations between triplet repeat expansion and clinical features in Huntington's disease. *Arch Neurol* 1995; 52: 749-53.
5. C. E. Coffey, J. F. Lucke, J. A. Saxton, G. Ratcliff, L. J. Unitas, B. Billig, R. N. Bryan. Sex differences in brain aging: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol* 1998 Feb; 55(2): 169-179.
6. D. F. Emerich, S. R. Win et al. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 1997; 386: 395-9.
7. G. M. Halliday, D. A. McRitchie, V. Macdonald, K. L. Double, R. J. Trent, E. McCusker. Regional brain specificity of brain atrophy in Huntington's disease. *Exp Neurol* 1998;154(2):663-72.
8. Lucotte G, Gerard N, Roubertoux P, Schmitt I, Riess O. Relationships of the 2642 deletion polymorphism (delta 2642) in the huntingtin gene with the CAG repeat expansion length and age at onset of the disease. *Genet Couns* 1996; 7(4): 297-302.
9. P. Nopoulos, M. Flaum, D. O'Leary, N. C. Andreasen. Sexual dimorphism in the human brain: evaluation of tissue volume, tissue composition and surface anatomy using magnetic resonance imaging. *Psychiatry Res* 2000 Feb 28; 98(1): 1-13.
10. N. Raz, I. J. Torres, J. D. Acker. Age, gender, and hemispheric differences in human striatum: a quantitative review and new data from in vivo MRI morphometry. *Neurobiol Learn Mem* 1995; 63(2): 133-42.
11. A. L. Reiss, M. T. Abrams, H. S. Singer, J. L. Ross, M. B. Denckla. Brain development, gender and IQ in children. A volumetric imaging study. *Brain* 1996; Oct; 119 (Pt 5): 1763-74.
12. A. Rosenblatt, R. R. Brinkman, K. Y. Liang, E. W. Almqvist, R. L. Margolis, C. Y. Huang, M. Sherr, M. L. Franz, M. H. Abbott, M. R. Hayden, C. A. Ross. Familial influence on age of onset among siblings with Huntington disease. *Am J Med Genet* 2001; 8;105(5): 399-403.
13. J. Roth, J. Židovská, Š. Růžičková, E. Havrdová, M. Preiss, T. Uhrová, V. Línek, P. Doubek, M. Volfová, R. Jech, J. Bauer, E. Růžička. Huntingtonova choroba: vztahy mezi klinickými příznaky, počtem CAG tripletů a atrofií caput nuclei caudati v CT obrazu. *Sborn. lék.* 1999; 1: 39-44.
14. J. Roth, E. Havrdová, E. Růžička. Atrophy of caudate nucleus in Huntington's disease measured by means of computed tomography. *J. Neurol*, 2000; 415, 880-881.
15. P. Sharma, L. Savy, J. Britton et al. Huntington's disease: a molecular genetic and CT comparison. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60: 206-8.
16. Y. Trottier, V. Biancalana, J. L. Mandel. Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J. Med Genet* 1994; 31: 377-382.
17. Yu P et al. Genomic organization and expression analysis of mouse kynurenine aminotransferase II, a possible factor in the pathophysiology of Huntington's disease. *Mamm Genome* 1999; 10: 845-52.



2. místo

DIAGNOSTICKÝ A TERAPEUTICKÝ PŘÍSTUP K ALERGIÍ NA BÍLKOVINU KRAVSKÉHO MLÉKA V DĚTSKÉM VĚKU.



Autorka: Tereza Fuchsová

Školitel: prim. MUDr. Pavel Frühauf, CSc. - Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF a VFN

■ Alergie na bílkovinu kravského mléka (ABKM) je onemocnění převážně kojeneckého věku. ABKM je definována jako nežádoucí reakce na bílkovinu kravského mléka v důsledku imunitní hypersenzitivity. Jedná se o onemocnění s nejednotnou patogenezi, což znamená, že se na rozvoji ABKM u různých pacientů podílí více různých imunitních mechanismů. To také znamená, že ne u všech dětí probíhá ABKM jako klasické alergické onemocnění cestou IgE-zprostředkované reakce. V těchto případech je používání pojmu alergie zavádějící. Pro ABKM je typický rozvoj tolerance bílkoviny kravského mléka.

Jeho incidence v kojenecké populaci ve světě je přibližně 2-3%. V ČR byla v roce 1999 provedena retrospektivní dotazníková studie u praktických lékařů pro děti a dorost a zjištěna incidence 0,67% (tab. 1). Takto významný rozdíl lze vysvětlit buď opravdu nižším výskytem ABKM nebo nedokonalou diagnostikou dětí s ABKM.

Tab. 1.:

Země	Autor	Rok	Incidence [%]
Švédsko	Jakobsson	1979	1,9
Anglie	Hide, Guyer	1983	2,5
USA	Bock	1987	2,2
Dánsko	Host	1988	2,3
Holandsko	Schrander	1993	2,3
Finsko	Saarinen	1999	2,4
ČR	Frühauf	1999	0,67

ABKM se klinicky manifestuje v různých systémech, nejčastější jsou projevy kožní, gastrointestinální nebo respirační, přičemž projevy se mohou kombinovat. Klinická manifestace závisí na objemu vypitého mléka a souvisí s dobou mezi vypitím mléka a rozvojem reakce. Nejkratší doba rozvoje reakce (řádově v minutách) se vyskytuje u projevů typu urtiky, exantému, zvracení, pískání - wheezingu, případně anafylaktické reakce. Rozvoj reakce v řádu dnů se projevuje nejčastěji jako ekzém nebo průjem.

Všeobecně uznávanou terapií ABKM je eliminace bílkoviny kravského mléka a jeho náhrada extenzivními proteinovými hydrolyzáty bílkoviny kravského mléka. Asi pro 5- 10% dětí není proteinová hydrolyza dostatečným ošetřením podávané bílkoviny a potřebují syntetické formule na bázi aminokyselin, u nichž je ještě více redukována alergenita.¹ Dle alterace výživového stavu dítěte je doporučeno znovuzavedení mléka do diety. Jedním z důvodů je i nákladnost terapie proteinovými hydrolyzáty.

■ Soubor

Do souboru bylo zařazeno 21 dětí v kojeneckém věku, odeslaných ke gastroenterologickému vyšetření na KDDL 1. LF UK a VFN. Jednalo se o děti se suspektní ABKM.

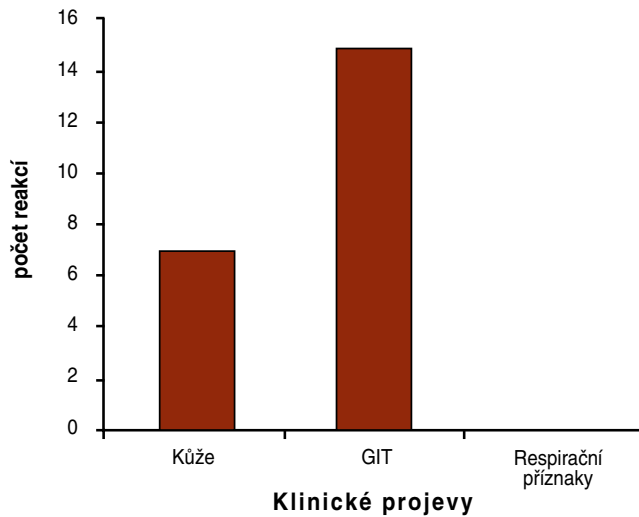
V souboru jsme sledovali následující parametry:

- Klinickou manifestaci příznaků.
- Dobu výskytu prvních příznaků a dobu od prvního kontaktu s kravským mlékem.
- Anamnesticky jsme sledovali rodinnou alergickou zátěž.
- Délku kojení.
- U některých dětí byl proveden a vyhodnocen reexpoziční test.
- Sledovali jsme rozvoj tolerance.

■ KLINICKÁ MANIFESTACE

ABKM se v našem souboru projevovala na kůži a v gastrointestinálním systému. Respirační projevy se v souboru neobjevily - jednalo se o děti vyšetřené v gastroenterologické ambulanci. (Tab. 2 , Obr. 1). Kožní příznaky měli formu

Obr. 1.:



urtiky, exantému nebo ekzému. V souboru se objevily v 33% s tím, že více se vyskytoval ekzém, exantém nebo urtika se v souboru vyskytly v 9,5%. Četnost gastrointestinálních projevů v souboru byla 71%. Gastrointestinální projevy měly formu průjmů, přičemž enterorhagie se objevily ve 24%.

Děti, u kterých není v tabulce uveden ani kožní ani gastrointestinální projev, byly na ambulanci odeslány z důvodu neprospívání. V souboru se také v jednom případě vyskytl jako jeden z projevů ABKM neklid dítěte. Děti, u kterých se ABKM projevuje těmito nespecifickými příznaky (neklid, neprospívání), patří pravděpodobně do výše zmíněné skupiny nedokonale diagnostikovaných dětí.²

Tab. 2.:

		KLINICKÉ PROJEVY				
		Kůže		GIT		Respirační systém
č.	Rok nar.	urtica, exantém	ekzém	zvracení	průjem	pískání, rýma
1	1999	-	+	-	+	-
2	1999	-	-	-	enterorhag.	-
3	1999	-	+	-	+	-
4	2000	-	-	-	+	-
5	2000	-	-	-	enterorhag.	-
6	2000	-	-	-	-	-
7	2000	-	+	-	-	-
8	2000	-	-	-	+	-
9	2000	+	-	-	-	-
10	2000	-	+	-	+	-
11	2000	-	+	-	-	-
12	2000	-	-	-	-	-
13	2000	-	-	-	+	-
14	2000	-	-	-	+	-
15	2000	+	-	-	+	-
16	2000	-	-	-	enterorhag	-
17	2000	-	-	-	enterorhag	-
18	2001	-	-	-	+	-
19	2001	-	-	-	+	-
20	2001	-	-	-	enterorhag	-
21	2001	-	-	-	-	-

■ Doba výskytu prvních příznaků

ABKM je onemocnění kojeneckého věku, průměrný věk rozvoje ABKM je ve světě různý, ale nejčastěji je udávána hodnota 4 měsíce.

V našem souboru se ABKM rozvinula v průměru v 2,9 měsíci, je ovšem nutno zdůraznit, že zjištěné hodnoty se pohybují od 0 do 9 měsíců věku. (Obr. 2, Tab. 3) Věk při rozvoji reakce souvisí se zavedením kravského mléka do výživy. Zde můžeme uvažovat i důležitost podání dítěti tzv. "první láhve" dítěti v porodnici před rozvojem laktace.

Obr. 2.:



Tab. 3a.:

Číslo	rok narození	první příznaky
1	1999	4
2	1999	3
3	1999	4
4	2000	2
5	2000	4
6	2000	4,5
7	2000	0,5
8	2000	1,5
9	2000	8
10	2000	2,5

Tab. 3b.:

Číslo	rok narození	první příznaky
11	2000	9
12	2000	3
13	2000	8
14	2000	0
15	2000	0
16	2000	1
17	2000	3
18	2001	2
19	2001	2
20	2001	0
21	2001	1

Tab. 4.:

č.	Rok nar.	RA	pozn.
1	1999	-	-
2	1999	-	-
3	1999	+	O-polyv., S-exem
4	2000	+	M-PNC
5	2000	+	O-polyv., M-polyv.
6	2000	-	-
7	2000	-	-
8	2000	-	-
9	2000	+	S-ABKM
10	2000	+	S-exem
11	2000	+	O-polyv., M-astma
12	2000	+	M-polyv.
13	2000	-	-
14	2000	-	-
15	2000	-	-
16	2000	-	-
17	2000	+	O-senná rýma
18	2001	+	O-polyv.
19	2001	+	O-astma, polyv.
20	2001	-	-
21	2001	-	-

Tab. 5.:

č.	rok nar.	doba kojení
1	1999	1
2	1999	6
3	1999	9
4	2000	4
5	2000	6
6	2000	2,5
7	2000	0,5
8	2000	2
9	2000	8
10	2000	3
11	2000	9
12	2000	4
13	2000	12
14	2000	5
15	2000	0
16	2000	1
17	2000	4
18	2001	2
19	2001	1
20	2001	5
21	2001	1

• O-otec • M-matka • S-sourozenec

■ RODINNÁ ALERGICKÁ ZÁTĚŽ

Sledovali jsme výskyt alergických reakcí v rodinách pacientů s ABKM. (Tab. 4) Zjistili jsme, že pozitivní alergická rodinná zátěž byla u 48% dětí. U 9,5% dětí jsme anamnesticky zjistili ABKM u sourozence.

■ DÉLKA KOJENÍ

Děti byly v průměru kojeny 4 měsíce. (Tab.5) Délka kojení se shoduje s údaji převzatými z ÚZIS pro rok 2000 (Obr.3).

■ EXPOZIČNÍ TEST

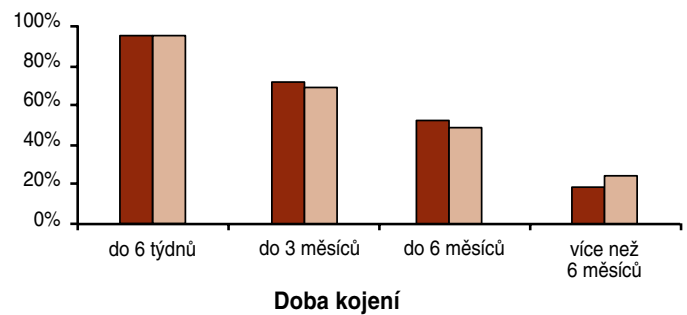
Vzhledem k tomu, že ABKM nelze vyloučit žádným laboratorním vyšetřením. Lze je používat pouze u pacientů, u kterých ABKM probíhá cestou IgE zprostředkované reakce. Z těchto důvodů je jediným všeobecně uznávaným standardem v diagnostice používán expoziční test. Expoziční test je obvykle prováděn otevřenou formou, což znamená, že je podáno dítěti kravské mléko (používají se preparáty se sníženým obsahem laktózy) a následně se sleduje rozvoj příznaků ABKM. Pokud nedojde k rozvoji příznaků a dítě snáší kravské mléko bez obtíží, můžeme konstatovat rozvoj tolerance.

V našem souboru byl expoziční test proveden u 38% dětí (Tab. 6). U 75% z nich došlo znovu k rozvoji příznaků ABKM, u 25% jsme po provedení expozičního testu mohli konstatovat toleranci kravského mléka.

Zaznamenali jsme reakce:

- Kožní reakce - 50%
- Gastrointestinální příznaky - 37,5%
- Neklid - 12,5%

Obr. 3



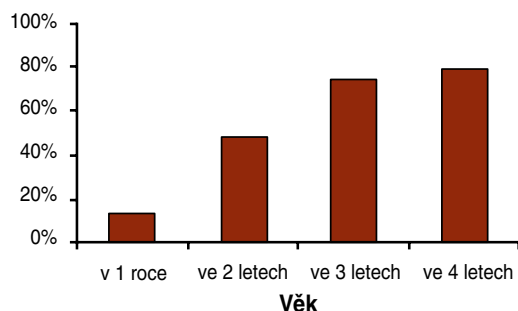
Tab. 6.:

č.	Rok nar.	Expo test	urtica, exantém	ekzém	zvracení	průjem	pískání	rýma	neklid
1	1999	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1999	+	+	-	-	-	-	-	-
3	1999	-	-	-	-	-	-	-	-
4	2000	+	-	+	-	-	-	-	-
5	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
6	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
7	2000	+	-	-	+	-	-	-	+
8	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
9	2000	+	-	+	-	-	-	-	-
10	2000	+T	-	-	-	-	-	-	-
11	2000	+	-	+	-	-	-	-	-
12	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
14	2000	+	+	-	-	+	-	-	-
15	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
16	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
17	2000	+T	-	-	-	-	-	-	-
18	2001	-	-	-	-	-	-	-	-
19	2001	-	-	-	-	-	-	-	-
20	2001	-	-	-	-	-	-	-	-
21	2001	-	-	-	-	-	-	-	-

■ ROZVOJ TOLERANCE

Pro ABKM je typický rozvoj tolerance kravského mléka. K rozvoji tolerance dochází v prvních letech věku dítěte s tím, že v předškolním věku toleruje kravské mléko přibližně 80% dětí s ABKM (Obr. 4). V našem souboru došlo k rozvoji tolerance u 14,3% dětí.

Obr. 4.:



■ Závěr a diskuse

V gastroenterologické ambulanci KDDL 1.LF UK byl vyšetřen soubor 21 dětí. Jednalo se o děti se suspektní ABKM v kojeneckém věku. Děti měly kožní (33%), gastrointestinální (71%) nebo celkové příznaky ABKM. Všem dětem byla nasazena dieta ve smyslu eliminace kravského mléka. Kravské mléko bylo nahrazeno extenzivními proteinovými hydrolyzáty. U dětí byla zjištěna ve 48% pozitivní alergická rodinná zátěž. U 38% dětí byl proveden expoziční test, u 75% z nich došlo znovu k rozvoji příznaků, u 25% byla konstatována tolerance kravského mléka. Nelze vyslovit souvislost s délkou kojení.

LITERATURA

1. P. Frühauf, *Obtíže a možnosti diagnostiky a terapie alergie na bílkovinu kravského mléka v dětském věku*, *Prakt. lékař*, 2000/3
2. P. Frühauf, *Může mít alergie na bílkovinu kravského mléka neurologické projevy?*, *Čes.-Slov. Pediat.*, 57/2002
3. E. Isolauri, K. Turjanmaa, *Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis*, *J. Allergy Clin Immunol.* 97/1996
4. C. F. Macdougall, A. J. Cant, A. F. Colver, *How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland.*, *Arch Dis Child* 2002, Apr.
5. B. Wutrich, B. K. Ballmer-Weber, *Food induced anaphylaxis*, *Allergy* 2001, 56
6. S. A. Bock, A. Munoz-Furlong, H. A. Sampson, *Fatalities due to anaphylactic reaction to food*, *J. Allergy Clin Immunol.* 2001, Jan
7. J. A. Walker-Smith, *Diagnostic criteria for gastrointestinal food allergy in childhood*, *Clinical and Experimental Allergy*, 1995/25



2. místo PARANEOPLASTICKÉ AUTOPROTIILÁTKY - METODIKY, PRVNÍ ZKUŠENOSTI



Autorka: Zdenka Vaňková

Školitelé: prof. MUDr. T. Fučíková, DrSc., RNDr. I. Janatková
- Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF a VFN

■ Úvod

Paraneoplastické syndromy jsou heterogenní skupinou symptomů a funkčních poruch u pacientů s maligním tumorem, které jsou v příčinné souvislosti s primárním nádorem, ale nejsou způsobeny přímou invazí nádoru, metastázami, nádorem navozenou koagulopatií, vaskulárními poruchami, infekcí, metabolickým a nutričním deficitem, nebo mechanismy souvisejícími s terapií maligního nádoru⁽¹⁾. Jejich incidence je udávána 7-15% u dospělých a mnohem méně u dětských pacientů s maligním nádorem⁽²⁾. Paraneoplastické projevy se typicky nevyskytují v místě primárního nádoru nebo jeho metastáz, ale spíše na vzdálených místech. Paraneoplastické syndromy se obvykle objevují paralelně s nádorem, ale mohou být přítomny již v raných stádiích a sloužit jako časný indikátor maligní choroby. Jelikož paraneoplastické syndromy mohou mít větší vliv na kvalitu života a dobu přežití pacienta než vlastní maligní nádor, musí být kladen důraz na jejich včasnou diagnostiku a terapii.

Neurologické paraneoplastické syndromy jsou degenerativní onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému, nebo svalové tkáně, která vznikají v souvislosti s malignitou bez přímé invaze nádoru. Paraneoplastické postižení nervového systému u pacientů s maligním nádorem bylo poprvé neurology popsáno již před více než šedesáti lety⁽¹⁾. Od té doby bylo zdokumentováno mnoho neurologických syndromů, jejichž výskyt může být asociován s přítomností maligního nádoru. Tímto nádorem bývá nejčastěji malobuněčný plicní karcinom (small cell lung cancer (SCLC)), ale mohou to být i gynekologické karcinomy aj. Údaje o incidenci neurologických paraneoplastických syndromů u pacientů s malignitou se výrazně liší, a to v rozmezí 1-50%⁽²⁾; u malobuněčného plicního karcinomu je uváděna incidence asi 4%⁽³⁾. Hlavní roli v patofyziologii těchto syndromů hraje autoimunitní proces spuštěný přítomností nádoru v organismu⁽²⁾. Bylo detekováno a charakterizováno více než deset tzv. paraneoplastických autoprotilátek (viz.tab.1), tedy protilátek proti vlastním strukturám organismu, které se vyskytují pouze u pacientů s maligním nádorem, a jejichž objevení se může předcházet diagnóze maligního onemocnění až o několik měsíců⁽²⁾. Nejznámější paraneoplastické autoprotilátky jsou ANNA-1 (= AntiNeuronal Nuclear Antibody) = anti-Hu (tento název pochází z první slabiky příjmení pacienta, u kterého byly tyto protilátky poprvé objeveny), PCA-1 (= Purkinje Cell Antibody) = anti-Yo a ANNA-2 = anti-Ri .

Přehled neurologických paraneoplastických syndromů:

- Paraneoplastická cerebelární degenerace
- Paraneoplastická encefalomyelitida a paraneoplastická senzitivní neuropatie
- Opsoklonus-myoklonus
- Senzomotorická neuropatie
- Lambertův-Eatonův myastenický syndrom
- Paraneoplastická neuromyotonie a stiff-man syndrom
- Paraneoplastická degenerace sítnice
- Paraneoplastická polymyozitida a dermatomyozitida

■ Cíl práce

Problematika stanovení paraneoplastických autoprotilátek se dotýká třech oblastí: 1) technicko-metodologická oblast (vhodný metodologický postup, optimální postup pro stanovení pozitivního výsledku, vyloučení falešně pozitivních výsledků); 2) diagnostická oblast (využití v diagnóze karcinomů, diferenciální diagnóza neurologických onemocnění, kdy symptomy mohou imitovat řadu jiných nosologických jednotek); 3) preventivní oblast (časný záchyt karcinomu

Tab. 1.: Přehled a charakteristika paraneoplastických autoprotilátek (2, 5, 8).

Autoprotilátka	Antigen	Western blot antigen	Imunohistochemie /imunofluorescence	Asociovaný karcinom	Klinické symptomy
Anti - Hu (ANNA-1)	HuD, HuC, Hel-N1	35-40 kDa	Jádra- CNS a PNS neurony, buňky retiny, adrenální kůry, nádoru, adenohipofýzy	SCLC, neuroblastom, karcinom prostaty, seminom, rhabdosarkom	Encefalomyelitida, senzitivní a autonomní neuropatie
Anti - Yo (PCA-1)	CDR34 CDR62	34 a 62 kDa	Cytoplazma -Purkyňovy bb., nádorové buňky	Karcinom ovaria, prsu; vzácně vejcovodu, plicní adenokarcinom	Akutní až subakutní cerebelární degenerace
Anti - Ri (ANNA-2)	Nova	55 a 80 kDa	Jádra- CNS neurony, buňky vejcovodu, retiny, nádoru	Karcinom prsu, vejcovodu, SCLC	Predominantní axiální ataxie, opsoklonus-myoklonus
Anti -Tr (PCA-2)	neznámý	-	Cytoplazma a dendrity Purkyňových bb.	Hodgkinova choroba	Subakutní cerebelární degenerace
Anti amphiphysin	Amphiphysin (synapt. vezikly)	128 kDa	Neurofilamenta (stratum moleculare a granulare)	Karcinom prsu, SCLC	Stiff-man syndrom
Anti - GAD (glutamát-dekarboxyláza)	GAD -glutamic acid decarboxylase	65 a 67 kDa (GAD65, GAD67)	Pankreatické ostrůvky a GAD v mozečku (synapse neuronů)	Karcinom prsu, SCLC, Hodgkinova choroba	Stiff-man syndrom
Anti - CV2	CV2	66 kDa	Oligodendrocyty	SCLC, thymom, sarkom, neuro-endokrinní tumor	Uveitida, retinopatie, encefalomyelitida
Anti - VGCC*)	VGCC	-	Neuromuskulární junkce	SCLC	Lambertův-Eatonův syndrom
Ma	neznámý	-	Jadérko neuronů	Karcinom prsu, varlat	Temporální epilepsie, amnézie
Anti - CAR*)	Recoverin	23kDa	Retina- kalcium vázající protein	SCLC	Degenerace sítnice

*)VGCC = voltage gated calcium channel (napětově řízený kalciový kanál)

*) CAR = carcinoma-associated retinopathy (retinopatie asociovaná s karcinomem)

- vzhledem ke známému faktu, že paraneoplastické autoprotilátky bývají přítomny již v raném stádiu a v jinak bezpříznakovém období). Ve své práci jsem se zaměřila především na oblast první, tedy na zhodnocení jednotlivých metod využitelných pro stanovení paraneoplastických autoprotilátek a na nalezení takového postupu a ředění, který by mohl být využit v běžné rutinní praxi, a to zejména proto, že této problematice byla zatím věnována poměrně malá pozornost.

■ Metodika

Antineuronální autoprotilátky lze stanovit metodou nepřímé imunofluorescence na zmražených vzorcích tkání myšího nebo opičího mozečku a mozku. Další možnostmi jsou ELISA, RIA, imunoperoxidázová nebo Western blot technika. Ve své práci jsem využila metodu nepřímé imunofluorescence a metodu Western blot.

Metoda nepřímé imunofluorescence využívá ke stanovení protilátek v séru (event. likvoru) pacienta fluorescenční látku, která může být detekována ve fluorescenčním mikroskopu. Ředěné sérum pacienta je inkubováno se vzorkem tkáně (myši, opičí). Pro porovnání byly využity substráty dvou různých firem obsahující různé typy neuronů, včetně neuronů myenterického plexu - fy. The Binding Site (opičí mozeček, mozek, periferní nerv, pankreas a myši žaludek; použito ředění 1:50, pro periferní nervy 1:10) a fy. Euroimmun (opičí mozeček, periferní nerv a střevo, použito ředění 1:10). Pokud jsou přítomny sledované protilátky, naváží se během inkubace na příslušné antigeny. Nenavázané protilátky jsou odmyty. V další fázi je přidán konjugát s navázaným fluoresceinem proti lidským imunoglobulinům. Po inkubaci se nenavázaný konjugát odmyje. Ve fluorescenčním mikroskopu pozitivní vzorky vydávají jasně zelenou fluorescenci v místech, kde se navázaly protilátky na antigeny. Pro odečítání výsledků byla definována přesná kritéria (viz.tab.2).

Tab. 2.: Kritéria nepřímé imunofluorescence pro rozlišení ANNA-1,2 a PCA-1

	NEURONY MOZEČKU			ŽALUDEK
	Purkyňovy bb.	Stratum moleculare	Stratum granulare	Neurony myenterického plexu
PCA-1 (anti-Yo) proximální	Jádro: (-) Cytoplazma: (+)- hrubá granula; dendrity (+)	Jádro: (-) Cytopl.: periferní (+) Golgi (+)	Jádro a cytopl.: (-) Příležitostně	Jádro: (-) Cytopl.: (+) - hrubá granula
ANNA-1 (anti-Hu)	Jádro: (+) - homogenní Jadérko: (-)	Jádro: (+) Jadérko: (-) Cytopl.: (+)	Jádro: (+) Jadérko: (-)	Jádro: (+) Jadérko: (-) Cytopl.: (+)
ANNA-2 (anti-Ri)	Jádro: (+) Jadérko: (-) Cytopl.: (+) - jemné tečky	Jádro: (+) Jadérko: (-) Cytopl.: (+)	Jádro: (+) Jadérko: (-)	(-)

Pro metodu Western blot se využívají výrobcem připravené proužky obsahující navázané antigeny, které byly získány z extraktů opičí tkáně (konkrétně mozečku) a elektroforeticky separovány. V případě stanovení paraneoplastických auto-protilátek jsou těmito antigeny Hu (38 kDa), Ri (34 a 62 kDa) a Yo (55 a 80 kDa). Proužky jsou inkubovány s ředěným sérem. V případě pozitivních vzorků se specifické protilátky navážou na příslušné antigeny. Pro detekci navázaných protilátek je použita enzymem-značená protilátka proti lidským Igl, která je schopna vyvolat barevnou reakci. Výsledek odečítáme pomocí šablony přiložené výrobcem.

Od listopadu 2001 do května 2002 bylo vyšetřeno celkem 63 vzorků. Z tohoto počtu bylo 19 sér pacientů s roztroušenou sklerózou (skupina a), 22 sér pacientů s IDDM (skup.b), 11 sér pacientů s karcinomem (skup.c, jednalo se 10x o gynekologický karcinom, 1x o SCLC), 1 sérum pacienta s nezhoubným nádorem (skup.c), 1 sérum pacienta s tumorem nejasného původu (skup.c), 1 sérum pacienta s kopřivkou (skup.c) a 8 sér od kontrolní (zdravé) populace (skup.d). Pacienti s autoimunitním onemocněním (RS a IDDM) byly do souboru zařazeny na základě hypotézy, že autoimunitní onemocnění, alergie i neoplazma jsou různými důsledky společného východiska, kterým je alterace funkce imunitního systému, proto se stanovení paraneoplastických autoprotilátek jeví jako zajímavé nejen u pacientů s nádorem, ale i u pacientů s autoimunitním onemocněním. Úzký vztah mezi těmito dvěma oblastmi lze vysledovat např. u pacientů se stiff-man syndromem, kdy kromě pozitivních anti-GAD protilátek je v 60% přítomno jiné orgánově specifické autoimunitní onemocnění⁽³⁾. Zařazení pacientů s IDDM do souboru vyšetřených osob je zajímavé i vzhledem k známé přítomnosti anti-GAD protilátek u této choroby.

Všechny vzorky byly testovány metodou nepřímé imunofluorescence (většina na setech dvou různých firem), pozitivní či suspektní nálezy dále testovány imunoblotovou analýzou (Western blot). Pozitivní nebo suspektní vzorky byly rovněž vyšetřeny rutinní metodou na stanovení antinukleárních, antimitochondriálních aj. autoprotilátek (metodou nepřímé imunofluorescence na řezech krysích jater, ledvin a žaludku - fy. The Binding Site), u některých pacientů byly dále vyšetřeny nádorové markery.

■ Výsledky

Tab. 3.: Přehled vyšetřených osob a pozitivních výsledků ve sledované oblasti paraneoplastických autoprotilátek.

Diagnóza	Počet		Věkové rozpětí	Pozitivní výsledky		
	muži	ženy		ANNA-1	ANNA-2	PCA-1
RS (skup.a)	19		22-51 let	0	IF: 2WB: 1	0
IDDM (skup.b)	14	8	21-64 let	IF: 1WB: 0	0	0
Karcinom (skup.c)	0	14	34-84 let	IF: 1WB: 0	IF:1WB: 0	IF: 1WB: 2
Kontrola (skup.d)	3	5	22-57 let	0	0	0
Celkem	20	43	21-84 let	IF: 2WB: 0	IF: 3WB: 1	IF: 1WB: 2

(IF=imunofluorescence, WB=Western blot)

Tab. 4.: Jiné zjištěné pozitivní výsledky u souboru pacientů.

Diagnóza	Počet		Jiné pozitivní výsledky			
	muži	ženy	ANF	GPCAb	anti-GAD	anti-myelinové protilátky
RS (skup.a)	3	16	IF1: 2/19 (r) IF2: 1/14 (r)	IF1: 2/19 (r)	0	IF1: 19/19 IF2: 7/14
IDDM (skup.b)	14	8	0	0	IF1: 1/22 (r)	IF1: 22/22 IF2: 6/10
Karcinom (skup.c)	0	14	IF1: 1/14 (n) IF2: 0	0	0	IF1: 14/14 IF2: 4/13
Kontrola (skup.d)	3	5	IF1: 1/8 (n) IF2: 0	0	0	IF1: 6/8 IF2: 0/6
Celkem	20	43	IF1: 4/63 IF2: 1/43	IF1: 2/63	IF1: 1/63	IF1: 61/63 IF2: 17/43

(Číslo před lomítkem - počet pozitivních výsledků, číslo za lomítkem - počet vyšetřených osob, IF1- imunofluorescence fy. The Binding Site, IF2 - imunofluorescence fy. Euroimmun, ANF - antinukleární faktor, GPCAb - protilátky proti parietálním buňkám žaludku, (r) - výsledek ověřen rutinní metodou, (n) - výsledek rutinní metodou nepotvrzen)

Tab. 5.: Výsledky stanovení protilátek proti periferním nervům (myelinu) u vybraných pacientů metodou nepřímé imunofluorescence (fy. The Binding Site - ředění 1:50).

Č.	Muž /žena	Nar.	Dg.	Výsledek při ředění 1:50	Výsledek při ředění 1:10 (viz.výše)
15a	ž	1966	G35 (RS)	-	+
16a	ž	1974	G35 (RS)	-	+
17a	ž	1978	G35 (RS)	velmi sl+	+
1b	m	1947	E10.7	-	+
2b	m	1944	E10.3	-	+
3b	m	1974	E10.3	-	+
4b	ž	1966	E10.9	-	sl+
10b	m	1952	E10.7	-	+
1d	ž	1979	-	-	+

Tab. 6 : Porovnání stanovení anti-GAD protilátek metodou ELISA a metodou nepřímé imunofluorescence.

Č.	Muž /žena	Nar.	Dg.	Nepřímá imunofluorescence	ELISA (koncentrace v ng/ml)
1b	m	1947	E10.7	neg.	poz. (676,28)
2b	m	1944	E10.3	neg.	neg.
3b	m	1974	E10.3	neg.	poz. (61,12)
4b	ž	1966	E10.9	neg.	poz. (89,13)
5b	m	1974	E10.9	neg.	neg.
6b	m	1964	E10.9	neg.	neg.
7b	m	1947	E10.7	neg.	poz. (353,02)
8b	m	1959	E10.9	poz.	poz. (342,99)
9b	m	1968	E10.9	neg.	neg.
10b	m	1952	E10.7	neg.	neg.

■ Diskuse

Ve sledované oblasti paraneoplastických autoprotilátek (ANNA-1, PCA-1, ANNA-2) bylo metodou nepřímé imunofluorescence nalezeno celkem 6 pozitivních výsledků při ředění doporučeném výrobcem (1:50 pro IIF1 - The Binding Site, 1:10 pro IIF2 - Euroimmun). Bylo to dvakrát ANNA-2 u pacientů s RS, 1x ANNA-1 u pacienta s DM, 1x ANNA-2 u SCLC, 1x PCA-1 u gynekologického karcinomu (Ca endometria) a 1xANNA-1 u nezhoubného nádoru (viz.tab.3). Dva výsledky byly pozitivní pouze v metodě IIF1, tři výsledky pouze v metodě IIF2 a jeden výsledek se ukázal pozitivní v obou metodách. Všechny tyto vzorky byly dále zkoumány metodou Western blot, kde se jako velmi suspektně pozitivní jevil vzorek pacientky s RS, nález PCA-1 u pacientky s gynekologickým karcinomem se nepotvrdil, ale byla nalezena suspektní pozitivita anti-Yo v pásu 62 kDa u jiných dvou pacientek (Ca ovaria a Ca krčku děložního).

U pacientky s RS s pozitivním výsledkem byly dále vyšetřeny nádorové markery CEA (= karcinoembryonální antigen - doplňkový marker pro nemalobuněčné karcinomy plic, karcinom endometria a karcinom mammy) a CA 15-3 (marker pro karcinom mammy), výsledek byl negativní. Jedná se o třicetiletou nemocnou s diagnózou roztroušené sklerózy, která však má některé atypické symptomy. Pacientka se léčí s boreliózou, dále má zduřelé uzliny v axillách, subfebrilie, (možná souvislost s boreliózou) a vypadávání vlasů. V poslední době se u ní objevilo zhoršení hybnosti a spastické stahy obličejového svalstva. Pacientce bylo rovněž provedeno kompletní interní vyšetření s negativním výsledkem. Je zajímavé, že výsledek byl pozitivní právě u takovéto atypické pacientky a její podrobnější vyšetření by mohlo být předmětem dalšího zkoumání.

Z 22 vzorků diabetických sér jsem metodou IIF1 stanovila pozitivní GAD protilátky 1x, u jiných pacientů vůbec nebyly přítomny. Pro srovnání bylo 10 z těchto vzorků (včetně 1 pozitivního v metodě IIF1) vyšetřeno i metodou ELISA (viz.tab.6). V této metodě bylo z těchto 10 vzorků pozitivních 5, vzorek odečtený jako pozitivní v IIF byl metodou ELISA stanoven rovněž jako pozitivní, zjištěná koncentrace byla poměrně vysoká, nikoli však nejvyšší, nepotvrdilo se tedy, že by rozdíl ve stanovení anti-GAD protilátek metodou IIF a ELISA odpovídal pouze větší schopnosti metody ELISA detekovat nižší koncentrace. Metoda IIF se tedy pro stanovení positivity anti-GAD protilátek u diabetiků jeví jako nevhodná, je otázkou, jaký by byl výsledek v případě GAD-pozitivity u paraneoplastických syndromů, neboť tento nález jsem nezaznamenala.

Kromě paraneoplastických autoprotilátek byly na těchto substrátech odkryty i jiné autoprotilátky. Jednalo se 2x o antinukleární protilátky u pacientů s RS, tento nález byl potvrzen i rutinním stanovením metodou nepřímé imunofluorescence na řezech krysích jater, ledvin a žaludku (fy.The Binding Site). Pozitivita antinukleárních protilátek ale v podstatě znemožňuje další odečítání výsledků metodou IIF, proto by zřejmě bylo nutné tyto pacienty (pokud by byly diagnostické nejasnosti) raději rovnou vyšetřovat metodou Western blot, aby nebyla případná pozitivita přehlédnuta. Jednou byly antinukleární protilátky odečteny i u pacientky s karcinomem a jednou u vzorku z kontrolní (zdravé populace), ale tyto nálezy se rutinní metodou nepotvrdily. Mohlo by být předmětem dalšího zkoumání, o jakou pozitivitu se jednalo.

V metodě IIF1 (kde je jako substrát použit žaludek) byly 2x u pacientů s roztroušenou sklerózou odkryty pozitivní protilátky proti parietálním buňkám žaludku, rovněž potvrzeny metodou používanou v rutinním provozu (krysí řezy jater, ledvin a žaludku). V jednom případě šlo o již známý nález, v jednom případě se však jednalo v podstatě o náhodný, první záchyt, což jistě může mít význam pro ošetřujícího lékaře a domnívám se proto, že by i tyto náhodné nálezy měly být hlášeny.

Další stanovenou pozitivitou byly protilátky proti myelinovému obalu periferních nervů. Tyto protilátky byly při ředění 1:10 (doporučeném oběma výrobci jako dostatečném) v metodě IIF1 pozitivní u všech vyšetřených vzorků až

na 2 z kontrolní populace. Pozitivita těchto protilátek u pacientů s RS a IDDM by se jistě dala vysvětlit jejich nemocí a nebyla by snad až tak závažná, pozitivita u 6 z 8 vzorků kontrolní populace již však jistě závažná je. Proto bylo 10 vzorků vyšetřeno zároveň při ředění 1:50 (viz.tab.5) a při tomto ředění již bylo 9 vzorků negativních, jeden pak velmi slabě pozitivní. Ředění 1:10 se tedy jeví jako nedostatečné a pozitivní výsledek při tomto ředění bez klinického významu. Metodou IIF2 bylo celkem vyšetřeno 43 vzorků, z tohoto počtu bylo negativních 26, zdravá populace zde vyšla kompletně negativní. Proto se pro stanovení těchto protilátek jeví jako lepší metoda IIF2 (fy.Euroimmun), metodu IIF1 lze využít pouze při větším ředění.

■ Závěr

Ve své práci jsem se snažila zejména získat první zkušenosti se stanovením paraneoplastických autoprotilátek, které je přes jeho potenciační význam pro neurologii i onkologii stále poněkud opomíjeno. Zabývala jsem se touto problematikou zejména po stránce technicko-metodologické.

Pro vyšetření paraneoplastických autoprotilátek se jako vhodná screeningová metoda jeví metoda nepřímé imunofluorescence. Osvědčila se souprava fy. Euroimmun, ředění bych však doporučila 1:50. Výrobce navrhané ředění 1:10 není dostačující ani pro vyšetření autoprotilátek u periferních nervů, neboť v tomto případě byl pozitivní náález i u 75% zdravé populace. K vyšetření autoprotilátek proti GAD u diabetiků je výhodnější a mnohem citlivější metoda ELISA než metoda nepřímé imunofluorescence. Pro všechny pozitivní výsledky metody nepřímé imunofluorescence je nutná konfirmace metodou Western blot.

Na souboru 55 nemocných (roztřesená skleróza, inzulin-dependentní diabetes mellitus, karcinom (event.jiná diagnóza)) byla suspektní pozitivita potvrzena metodou Western blot ve 3 případech, tj. v 5,5%.

Předběžné klinické výsledky nasvědčují, že vyšetření paraneoplastických autoprotilátek má klinický význam jednak u pacientů s karcinomem, jednak i u pacientů s autoimunitním onemocněním, protože průběh základního onemocnění měl atypický průběh. Předpokládám rozšíření studie na větší počet nemocných.

LITERATURA

1. E. Havrdová et al.: *Neuroimunologie*, kap.10, str.318-333, Maxdorf, Praha 2001
2. T. Lothar et al.: *Clinical Laboratory Diagnostics - Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*, kap. 35, str. 997-1003, TH-Books Verlagsgesellschaft mBH, Frankfurt am Main, 1998
3. J. B. Peter, Y. Shoenfeld: *Autoantibodies*, B. V. Elsevier Science, Amsterdam 1996
4. A. R. Bradwell, R. P. Stokes, G. D. Johnson: *Atlas of Autoantibody Patterns on Tissues*, str. 82-88, AR Bradwell, Birmingham 1997
5. A. R. Bradwell, R. P. Stokes, G. D. Johnson: *Advanced Atlas of Autoantibody Patterns on Tissues*, str. 63-77, AR Bradwell, Birmingham 1997
6. P. Štourač, Z. Kadaňka: *Autoimunitní paraneoplastická encefalomyelitida/ senzitivní polyneuropatie - klinická a imunologická analýza*, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, 63/96, 2000, No. 5, str. 274-278
7. P. Štourač., D. Doležil, H. Kvapilová, Z. Kadaňka: *Autoimunitní paraneoplastická mozečková degenerace - klinická a imunologická analýza*, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, 63/96, 2000, No. 2, str. 97-101
8. B. Giometto, B. Taraloto, F. Graus: *Autoimmunity in Paraneoplastic Neurological Syndromes*, Brain Pathology 9: 261-273, 1999
9. J. Dalmau, H. S. Gultekin, J. B. Posner: *Paraneoplastic Neurological syndromes: Pathogenesis and Pathophysiology*, Brain Pathology 9: 275-284, 1999
10. K. Conrad, R. L. Humbel, M. Meurer, Y. Shoenfeld, E. M. Tan: *Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity*, str. 580-618, Pabst Science Publishers, Dresden 2000
11. www.euroimmun.de/neuronale.htm
12. www.bindingsite.co.uk



3. místo KOUŘENÍ, PREVENTIVNÍ KARDIOLOGIE A STŘEDOŠKOLÁCI



Autorka: Lenka Božanská

Školitel: MUDr. Eva Králíková, CSc. - Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

■ Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích, jsou příčinou více než 56% úmrtí, proto zasluhují naši pozornost. Jejich chronické formy způsobují značné snížení kvality života nemocných. Známe vliv několika faktorů, které se podílejí na jejich vzniku a progresi a víme, že řada z nich je ovlivnitelná. Jedním z nich je kouření, které se celkově podílí na vzniku asi 24 onemocnění tří skupin. Způsobuje 20% kardiovaskulárních onemocnění, 30% nádorových onemocnění, nejčastěji rakoviny plic, a 75% chronických plicních onemocnění, především chronickou bronchitidu a emfyzém. Prevalence kuřáctví je u nás kolem 32% (35% muži a 27 % ženy). V současnosti mírně klesá u starších mužů, zatímco výrazně stoupá u dospívajících a mladých, především žen (kolem 40 - 50% kuřáků ve věku 18 let, 20% ve věku 15 - 16 let).

Projekt prevence kardiovaskulárních onemocnění (KVO) na středních školách je preventivním programem zaměřeným na zlepšení informovanosti studentů středních škol věkové skupiny 15 - 20 let. Jeho cílem je vzbudit zájem mladých lidí o problematiku KVO, taky o své vlastní zdraví obecně a upozornit, že i v mladém věku je působení rizikových faktorů prokazatelné a nezanedbatelné. V projektu jsme se soustředili především na vysvětlení souvislosti vzniku a progresi KVO a působení rizikových faktorů - kouření a nesprávné výživy.

■ Metodika

Celý projekt se skládal z několika navazujících částí. Připravili jsme úvodní dotazník a ve spolupráci se středoškolskými pedagogy jsme požádali studenty o jeho vyplnění. Položili jsme studentům 15 otázek, které se týkaly znalosti pojmů z dané problematiky - co jsou kardiovaskulární onemocnění (KVO), rizikové faktory (RF), ateroskleróza, stres, zdravá dieta. Dále znalost rizikových faktorů KVO, důsledků jejich působení a způsobů, jak onemocněním předcházet. Část otázek zjišťovala, jestli a jak sami studenti předcházejí KVO, jak hodnotí svůj životní styl v souvislosti s uvedenými RF. Otázky byly formulovány způsobem, který vyžadoval odpověď vlastními slovy. Cílem bylo zjistit aktivní znalosti studentů středních škol a umožnit nám lepší přípravu další části.

Následovalo zadání práce studentům 5. ročníku 1.LF UK v rámci terénní stáže z hygieny a epidemiologie. Probírali jsme cíle projektu, osnovu přednášek a možnosti použití různých pomůcek pro zpestření hodin. Osnova výkladu obsahovala základní vysvětlení anatomie, fyziologie a patologie srdce a cévního systému. Odborná část byla přizpůsobena dosavadním znalostem studentů z hodin biologie, případně biologických seminářů. Rozlišovali jsme přinejmenším dvě kategorie - před nebo po absolvování výuky biologie člověka. Výklad byl dále věnován mechanismům působení jednotlivých RF a pozornost soustředěna na nejčastěji uváděné RF v dotazníku ve spojení s vlastním životem - kouření a výživu. Různou mírou byl doplněn podle zájmu studentů o vysvětlení dalších vlivů - stresu, fyzické aktivity, některých neovlivnitelných faktorů jako pohlaví, věk, dědičné dispozice, některé onemocnění. Důležitou součástí přednášek a jejich významným oživením, o které jsme se snažili především, bylo využití různých dostupných pomůcek. Kromě barevných plakátů a obrázků jsme studentům poradili, jak si spočítat BMI, zájemcům jsme změřili krevní tlak nebo množství CO ve vydechaném vzduchu přístrojem pro objektivizaci kuřáctví.

Na závěr hodiny jsme rozdali kratší dotazník, jehož vyplnění trvalo cca 5 min. Testovou formou jsme zjišťovali porozumění přednášce a zajímavost vybraného tématu, studenti mohli známku ohodnotit přednášející mediky a vyjádřit vlastní přístup k předcházení KVO. Zařadili jsme tři otázky typu: Co je infarkt myokardu, ateroskleróza, hypertenze? a nabídli na výběr několik jednoduchých správných a nesprávných definic. Požádali jsme také o uvedení 4 důležitých RF KVO. Pro pozdější zpracování a charakteristiku skupiny jsme zjišťovali pohlaví a věk zúčastněných studentů středních škol.

■ Výsledky

Hodnocení u jednotlivých částí projektu probíhalo odděleně:

• *Úvodní dotazník* vyplnilo 112 studentů středních škol - 73 dívek (65%) a 39 kluků (35%) věkové skupiny 16 - 19 let. Studenti už v této části projeví zájem o téma KVO a nezbytnou ochotu spolupracovat. Vyhodnocení bylo komplikováno zvolenou formou otázek, studenti psali vlastní myšlenky. Na druhou stranu to přesně splnilo náš záměr a zjistili jsme, že znají pojmy, které jsou běžně slyšet v médiích, ale neví, co přesně znamenají, málokdy je umí vysvětlit a proto nenacházejí souvislosti mezi teoreticky známými rizikovými faktory a vlastním životem, který zatím není provázen vážnou nemocí. Uváděli více možností, podle svého uvážení; ve vyhodnocení byly použity nejčastější formulace odpovědí odpovídající znalostem lékařských termínů u laické veřejnosti.

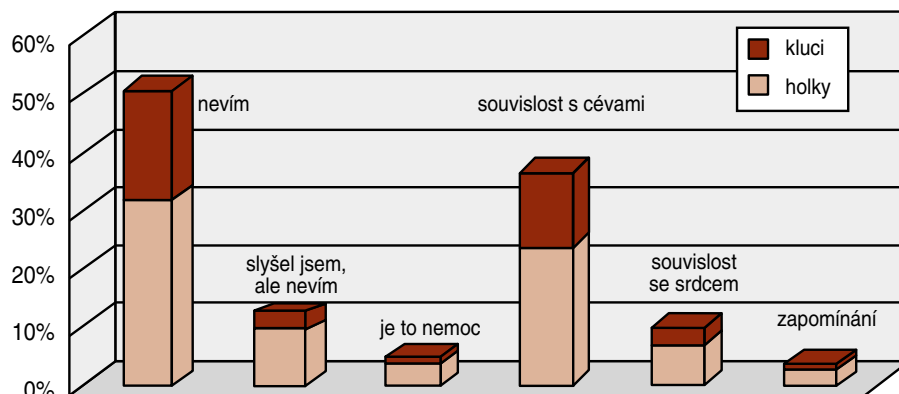
Pod pojmem KVO uvádí poruchy cév a srdce a/nebo infarkt 76% studentů. Další možnosti uvedla podstatně menší část dotázaných a to: ucpání a kornatění cév 23%, nedomykavost chlopní 22%, angina pectoris 20%. Další: mrtvice, vysoký krevní tlak, arytmie, šelest byly uváděny v méně než 10%.

U následujících dvou otázek je zajímavé jejich srovnání. První zjišťovala znalost rizikových faktorů KVO (ot. 1), druhá se ptala na možnosti (ot. 2), jak KVO předcházet. Tady studenti uváděli především negaci RF z otázky předchozí, frekvence pojmů se však odlišovaly: kouření 62% (ot. 1) proti nekouřit 41% (ot. 2); stres, rozčilování 58% (ot. 1) a vyhýbat se stresu, odpočívání 33% (ot. 2); špatná výživa 54% (ot.1) a zdravé jídlo 78% (ot. 2); nedostatek pohybu 30% (ot. 1) a aktivita, sport 70% (ot. 2). Zjistili jsme, že kouření je nejčastěji uváděným škodlivým faktorem a mezi způsoby předcházení jsou spíše známy zdravá výživa a sportování. Dalším uvedeným způsobem předcházení KVO byly lékařské kontroly a to pro 8% studentů.

Krevní tlak je pojmem často používaným a jeho význam známý mezi laickou veřejností. Předpokládali jsme proto jednoznačné odpovědi a taky alespoň představu o číselných hodnotách normálního a vysokého krevního tlaku. Jestli krevní tlak může být RF KVO odpovědělo 63% studentů ano a jen 22% studentů dále uvedlo správné hodnoty; 31% ano, ale hodnoty neuvedlo a 6% neví odpovědět. Myslíme si, že starším věkovým skupinám je pojem a hodnoty krevního tlaku znám lépe, mladí lidé většinou nemají potíže s tímto související.

Zjistili jsme, že pojem ateroskleróza patří k méně známým. 51% nezná, 13% připouští, že slyšeli, ale neumí vysvětlit, 37% uvádí alespoň souvislost s cévami, menší část se srdcem. Vyskytli se však i odpovědi, že je to neustálé zapomínání, nebo něco s páteří. Znázornění na obr. 1.

Obr. 1.:



Podle otázky:

Žiješ ty sám tak, abys předcházel vzniku KVO? se dotázaná skupina rozdělila na třetiny: ano odpovědělo 35%, částečně 34% a ne 31%. Dále sami uvádějí konkrétní příklady v souladu s výskytem nebo absencí výše zmiňovaných RF. Bez přímého dotazu uvádí 19% studentů, že kouří a 23% nekouří; zdravé stravování 45%, nezdravé stravování 24%.

Na další obecnou otázku, jestli kouření patří mezi RF KVO odpovědělo ano, resp. ano, bez pochyb 90% studentů; ne, resp. spíše ne 10%. Přímý konkrétní dotaz na vliv kouření změnil frekvence odpovědí ze 62% u otázky v úvodu dotazníku na 90% ve druhém případě.

Zajímalo nás také, na kolikáté místo v úmrtnosti v Evropě řadí studenti KVO: 1. místo 27%, 2. místo 31%, 3. místo 23%, 4. a 5. místo celkem 9%, neví 10% studentů.

Na dotaz o správné zdravé výživě uvádí studenti běžně známé doporučení (ovoce, zelenina, méně tučných jídel, atd.). Žádné z uvedených se však nevyskytovaly ve více než 57% odpovědí. Reflektuje to fakt, že neznáme univerzální několikáslovný návod na správnou výživu.

Podobně široké spektrum odpovědí bez výraznějších rozdílů jsme zaznamenali v otázce: Co je stres, jestli a jak se mu

lze vyhnout? Uvedme však, že pro 55% studentů je stres nedílnou součástí života, 24% se nejasně vyjadřuje, že se snaží nestresovat, 21% stres většinou nebo spíš nepociťuje.

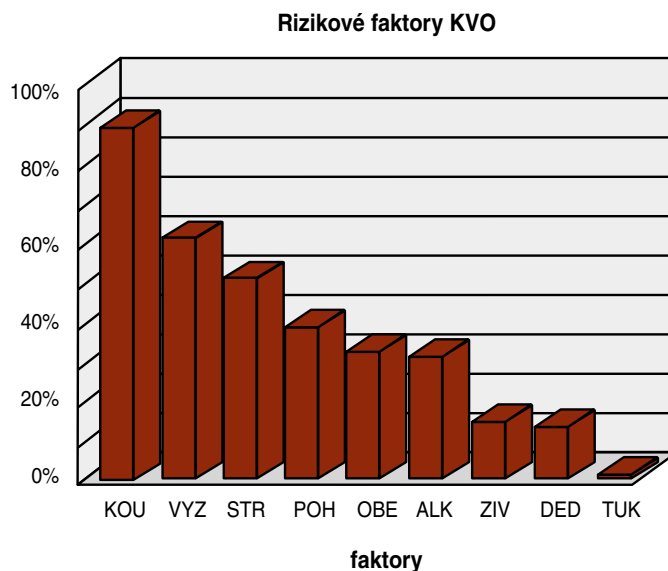
Odpočinek, sport, relaxace jsou důležitou součástí života 60% dotázaných. Negativní odpověď např. nesportuji, není čas, nebo relaxovat neumím uvádí 36%, neodpovědělo 4%.

- Po vyhodnocení dotazníku jsme přistoupili k přípravě *přednášek preventivního programu*. Projektu se zúčastnilo 24 studentů 5. ročníku 1.LF UK, kteří navštívili vybrané třídy šesti pražských středních škol. Hodnocení průběhu přednášek je přirozeně jenom ústní formou a nepřináší statisticky zpracovatelná data, v našem projektu však zaujímá důležité místo a probíhá na několika úrovních. Vyjádření středoškolského učitele přítomného na hodině, shrnutí vlastních zkušeností studenty medicíny a hodnocení studentů středních škol přítomných na přednášce (formou krátkého dotazníku).

- *Kontrolní dotazník* vyplnilo 230 studentů středních škol, 49% kluků a 51% dívek, průměrný věk 18 let (směrodatná odchylka = 1,53). Přednášce zcela porozumělo 79,1%, zčásti porozumělo 19,6%, neporozumělo 1,3% studentů. Jako zajímavou a přínosnou ji ohodnotilo 78,7%, 4,4% očekávalo spíše něco... (a dále uvádí, nejčastěji, že hodina bude delší, nebo že dostanou konkrétní návod, co dělat). Pro 16,9% byla náplň přednášky opakovaním. Aktivní snahu předcházet KVO vyjádřilo 23% studentů, snahu alespoň omezit RF KVO ve svém životě 65% a myšlenkou se nechce zatěžovat 12%. Ohodnocení přednášejících studentů podle školní stupnice: známkou 1 - 64,6%; známkou 2 - 28,7%; známku 3, 4, 5 celkem 6,7% studentů. Na otázky týkající se znalosti pojmů odpověděla valná většina studentů správně. Znázornění znalosti rizikových faktorů viz obr. 2. Ve srovnání s úvodním dotazníkem jsou správné odpovědi uváděné častěji, jelikož nejde o tutéž skupinu dotázaných, nelze jednoduše kvantifikovat získané vědomosti po absolvování přednášky.

Obr. 2.: Nejčastěji uváděné RF KVO v sestupném pořadí: kouření, nezdravá výživa, stres, nedostatek pohybu, obezita, nadměrné požívání alkoholu, obezita, vliv dědičnosti, množství tuku ve stravě.

Rizikové faktory KVO



Diskuse

Nejúčinnější formou preventivních programů pro mládež se ukázaly být doplňující peer-programy, tedy sdělování informací prostřednictvím vyškolených vrstevníků. Tyto ani další formy však nenašly v našich zemích širší uplatnění a celoplošné pokrytí, které by umožnilo ověření jejich úspěšnosti podložené důkazy. Náš projekt zapojil jako relevantní zdroj informací a motivace mediky rok před ukončením studia na lékařské fakultě. Preventivní působení je nezbytnou součástí lékařské profese, i když mnohokrát opomíjenou hlavně co se týče důslednosti. Proto jsme přesvědčeni, že náš projekt, třeba jen v malém počtu zúčastněných, může být přínosem pro obě strany. Těší nás snaha části studentů středních škol aktivně v budoucnu přistupovat k předcházení vzniku KVO. Chceme tato rozhodnutí ocenit a podpořit, protože pochvala je obecně uznávanou silnou motivací. Taky se snažíme vzbudit u studentů dosud nerozhodnutých nebo nezabývajících se touto myšlenkou potřebu zamyslet se nad působením rizikových faktorů. Běžně provázejí jejich život a jak víme, jsou často okolím tolerovány do té míry, že mladým lidem nedávají příležitost plně si uvědomit závažnost svého chování. Jde především o problém kouření. Naším cílem nebylo zjišťovat prevalenci kuřáctví mezi středoškoláky, uvědomujeme si, že mohlo být zajímavým srovnáním s pracemi zabývajících se touto problematikou. V rámci diskuse se studenty se však

otázka kolik lidí vlastně v konkrétní třídě kouří vyskytla často. Počty se vzájemně značně odlišovali od 15% až k víc než 50% v jednotlivých skupinách cca 30 lidí. Společným sdíleným poznatkem však byla ochota studentů otevřeně přiznat jestli a kolik kouří a to v přítomnosti spolužáků i učitelů. Méně otevřenosti jsme zaznamenali u dotazů na další drogy (marihuana, „tvrdé drogy“), ani tady jsme se nesetkali s úplným popřením. Může to být jedním z projevů obecného tolerantního nebo pasivního přístupu společnosti k daným problémům.

Nesporný je však zájem studentů o problematiku KVO a taky kouření. Pracujeme sice s dospívajícími lidmi, ale přirozená dětská zvědavost stále sehrává významnou roli. Je těžké určit do jaké míry ovlivní dostatečná informovanost o rizicích onemocnění způsob života (podívejme se na prevalenci kuřáctví u lékařů a zdravotních sester!), ale vlivem být může. Myslíme si, že i v tomto případě je nesmírně důležitým faktorem názor vrstevníků, nejen v negativním, ale taky v pozitivním smyslu. Je proto správné jejich názor podpořit.

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali s realizací projektu, především MUDr. Evě Králíkové, CSc. za cenné rady a připomínky, odborné vedení a zapůjčení pomůcek studentům. Dále všem ředitelům a učitelům středních škol za ochotu a umožnění realizace přednášek v době vyučování. V neposlední řadě děkuji všem přednášejícím studentům lékařské fakulty za jejich svědomitou přípravu a dobrou úroveň samotných přednášek a dalším za pomoc s organizací a přípravou.

■ Závěr

Cílem projektu bylo orientační zjištění úrovně vědomostí z problematiky kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a jejich rizikových faktorů (RF) u studentů středních škol a nalezení vhodné formy preventivního programu pro středoškoláky. Zjistili jsme poměrně dobrý teoretický základ u cílové skupiny, hlavním nedostatkem byla především pasivní znalost problematiky, neúplnost vědomostí a dostupných informací a tudíž zanedbatelné vnímání možného rizika ve vlastním životě. Setkali jsme se s pozitivním hodnocením všech zúčastněných stran. Důležitou roli sehrál aktivní přístup samotných středoškoláků, snaha dovědět se něco nového, ochota komunikovat se studenty lékařské fakulty a hlavně schopnost zhodnotit získané informace ve prospěch svého zdraví. Taky byla ověřena schopnost studentů lékařské fakulty vybrat ze širokého tématu to podstatné pro mladé lidi, podat odborné informace vhodnou formou, vysvětlit funkci systému a působení rizikových faktorů, jednoduše řečeno, mluvit s laickou veřejností o problémech, které se týkají obou stran. Svůj preventivně - pedagogický úkol zvládli a byl jistě zajímavou zkušeností. Cílová skupina se ukázala být vhodnou a přístupnou zvolené formě preventivního programu a mohla by být dále sledována z hlediska efektivity.

LITERATURA

1. E. Králíková, J. Kozák: *Odvykání kouření*, Maxdorf s.r.o., Praha, 1997
2. E. Králíková, J. Kozák, J. Rameš: *Mládež a kouření v Čechách*, *Čs. Pediat.*, 50, 1995, 11, 681-684
3. E. Králíková, J. Kozák, J. Rameš, L. Zámečník, I. Wallenfels: *Czech medical Faculties and Smoking*, *Central European Journal of Public Health*, 3 (39), 1995, 2, 97-99
4. K. Nešpor: *Návykové látky - Romantické období končí*, Sportprag, a.s., Praha, 1995



1. místo

DVOJÍ ÚČINEK APOCYNINU: INHIBITOR FAGOCYTÁRNÍ NADPH OXIDÁZY, STIMULÁTOR PRODUKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU V NEFAGOCYTECH



Martin Vejražka

Autoři: Martin Vejražka, Radan Míček

Školitel: prof. MUDr. Stanislav Štípek - Ústav lékařské biochemie 1. LF

■ Apocynin je přirozeně se vyskytující metoxy-substituovaný katechol, který se experimentálně používá jako inhibitor NADPH oxidázy. Jakkoli má výrazný inhibiční efekt ve studiích s neutrofily a makrofágy, nepůsobí jako inhibitor v nefagocytárních buněčných systémech. V našich pokusech dokonce stimuloval produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) fibroblasty cévní stěny. V experimentech s makrofágy apocynin způsobil zvýšení produkce ROS stanovené pomocí dichlordihydrofluorescinu (DCFH) během prvních 15 minut. Poté měl naopak inhibiční účinek, takže se zdá, že byl v přítomnosti leukocytární myeloperoxidázy a H_2O_2 přeměněn na jinou sloučeninu. Apocynin předem oxidovaný H_2O_2 a peroxidázou z křenu (HRP) měl bezprostřední inhibiční efekt na produkci ROS. V nefagocytech apocynin stimuloval produkci ROS a inhibiční účinek nebyl zaznamenán ani po 60 minutách. Apocynin uměle preaktivovaný H_2O_2 a HRP však snížil produkci ROS podobně, jako tomu bylo u makrofágů. Stimulační účinek na produkci ROS byl potlačen tironem a superoxidodismutázou (SOD), což nasvědčuje tomu, že produkovaná ROS je superoxid ($O_2^{\cdot-}$). Vliv apocyninu inhibovalo i difenyljenjodinium (DPI), inhibitor NADPH oxidázy bez scavengerového efektu. Lze shrnout, že apocynin stimuluje produkci $O_2^{\cdot-}$ buňkami. V přítomnosti peroxidázy a ROS je však konvertován na jinou sloučeninu, inhibující produkci $O_2^{\cdot-}$. Lze předpokládat, že za podmínek *in vivo* apocynin může mít opačný účinek na fagocyty a nefagocyty: působí jako inhibitor fagocytární NADPH oxidázy, avšak také jako stimulant produkce ROS v nefagocytech.

Apocynin (4-hydroxy-3-metoxyacetofenon, acetovanilon, CAS 498-02-2) je metoxy-substituovaný katechol, původně izolovaný z kořenů himalájské léčivé trvalky *Picrorhiza kurroa*¹. Podobně jako některé další methoxy-substituované katecholy² může inhibovat produkci superoxidu aktivovanými neutrofily, přičemž zůstává zachována jejich schopnost fagocytózy. Právě produkce superoxidu ($O_2^{\cdot-}$) a následně dalších reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) je podstatou mikrobicidní a cytotoxické funkce neutrofilů, podílí se však i na poškození vlastních tkání organismu při zánětu. V lidovém léčitelství se různé extrakty z *Picrorhiza kurroa* (pod lidovým názvem kutaki) používají v systémech Ājurvedy a Unani k léčbě stavů spojených s chronickým zánětem. V současnosti se tato sloučenina intenzivně studuje jako potenciální protizánětlivá látka s předpokládaným využitím zejména při léčbě artritidy¹. V pokusech se zvířaty byl prokázán dobrý efekt apocyninu i při léčbě aterosklerózy³ nebo v prevenci reperfučního poškození plic⁴.

Apocynin inhibuje tvorbu superoxidu prostřednictvím fagocytární NADPH oxidázy. Předpokládaný mechanismus jeho účinku je inhibice sestavení cytosolových a membránových podjednotek tohoto enzymu, pravděpodobně zablokováním sulfhydrylových skupin². Samotný apocynin nepůsobí jako scavenger ROS⁵.

Experimentálně se apocynin využívá jako modelový inhibitor fagocytární NADPH oxidázy. V našich pokusech jsme chtěli této látce, podobně jako někteří další autoři⁶, použít jako inhibitoru NADPH oxidázy v nefagocytech. Podání apocyninu však překvapivě nevedlo ke snížení produkce ROS, ale naopak k jejímu výraznému zvýšení. Někteří autoři již dříve vyslovili domněnku, že apocynin nepůsobí jako inhibitor NADPH oxidázy přímo, ale až po aktivaci peroxidem vodíku a peroxidázou². V místě zánětu jsou peroxid vodíku i myeloperoxidáza produkovány fagocyty, v nefagocytárních buňkách však prakticky chybí. Cílem naší práce bylo ověřit hypotézu, že apocynin má odlišný efekt na imunitně stimulované fagocytární buňky a na nefagocyty: v prvním případě působí jako inhibitor NADPH oxidázy a jeho podání tak vede ke snížení produkce ROS, ve druhém případě naopak produkci ROS stimuluje.

■ Materiál a metody

Veškeré chemikálie pocházely z běžných komerčních zdrojů a byly alespoň analytické čistoty. Apocynin, kultivační média, Hankův vyvážený roztok solí (Hank's balanced salt solution, HBSS), zymosan A ze *Saccharomyces cerevisiae*, Histopaque, 2',7'-dichlorofluoresceindiacetát (DCFH-DA), kataláza, superoxidodismutáza, difenyljenjodinium (DPI), peroxid

vodíku a tiron (4,5-dihydroxy-benzendisulfonová kyselina) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich Corp., USA. Peroxidáza z křenu (horse redish peroxidase, HRP) byla od ICN Biochemicals Inc.

Fibroblasty cévní stěny byly připraveny z aorty laboratorního potkana postupem obdobným, jako bylo publikováno v literatuře⁷. Stručně, v celkové anestézii byla vypreparována hrudní a břišní aorta laboratorního potkana, opláchnuta v kultivačním médiu F12K bez séra s 50 U.ml⁻¹ penicilinu a 50 µg.ml⁻¹ streptomycinu a sterilně rozstříhána na tenké prsténky. Ty byly položeny na kultivační polystyrénovou Petriho misku. Na každý kroužek byla položena kapka kultivačního média F12K s 10 % fetálního bovinního séra, penicilinem 50 U.ml⁻¹ a streptomycinem 50 µg.ml⁻¹. Po dvou dnech bylo doplněno stejné kultivační médium, to se dále měnilo dvakrát týdně. Při první pasáži (po třech týdnech od založení primokultury) jsme vysadili antibiotika. Fibroblasty jsme pasážovali jednou týdně v obvyklém ředění 1:4. Pro pokusy byly použity buňky mezi 7 a 12 pasáží.

Granulocyty a monocyty laboratorního potkana byly izolovány pomocí Histopaque 1083 a Histopaque 1077 (Sigma) podle protokolu dodávaného výrobcem. V krátkosti, ve čtyřech 15ml polypropylénových centrifugačních zkumavkách byly převrstveny vždy 3 ml Histopaque 1083 třemi mililitry Histopaque 1077. Nad gradient jsme položili vrstvu heparinizované krve laboratorního potkana ředěné fyziologickým roztokem 1:3. Po centrifugaci při 700 g po 30 minut se vytvořila vrstva granulocytů na rozhraní Histopaque 1083 a 1077 a vrstva monocytů na rozhraní Histopaque 1077 a ředěného séra. Izolované krvinky jsme dvakrát promyli ve fyziologickém roztoku a resuspendovali v MEM bez fenolové červeně.

Oponizovaný zymosan (serum treated zymosan, STZ) byl připraven ze zymosanu A ze *Saccharomyces cerevisiae*. Suspenzi zymosanu A (asi 5 mg.ml⁻¹) jsme vařili 20 minut na vodní lázni v HBSS. Nabobtnalý zymosan byl zcentrifugován a po odsátí supernatantu 30 minut inkubován v séru laboratorního potkana (5 mg zymosanu na 1 ml séra). Tento krok se opakoval celkem třikrát. Pak jsme zymosan dvakrát promyli v HBSS a resuspendovali na výslednou koncentraci 10 mg.ml⁻¹. Alikvóty se skladovaly při -85 °C.

2',7'-dichlorofluorescindiacetát (DCFH-DA) byl rozpuštěn v koncentraci 4 mmol.l⁻¹ v 96 % ethanolu, dále ředěn destilovanou vodou na koncentraci 250 µmol.l⁻¹. Tento zásobní roztok byl rozdělen do alikvótů a skladován při -85 °C v dusíkové atmosféře.

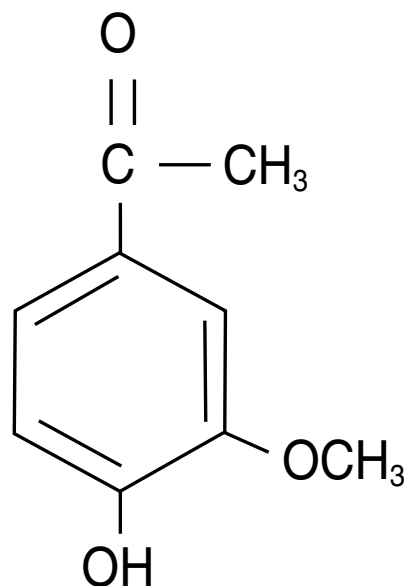
2',7'-dichlorofluorescin (DCFH) jsme připravili deesterifikací DCFH-DA jak bylo popsáno v literatuře⁸. Stručně, 0,5 ml DCFH-DA 1,0 mmol.l⁻¹ v methanolu jsme smísili s 2 ml 10 mmol.l⁻¹ NaOH. Deesterifikace probíhala 30 minut při pokojové teplotě, pak jsme roztok neutralizovali přidáním 10 ml 25 mmol.l⁻¹ fosfátového pufru, pH 7,4. Roztok byl uchováván při 4 °C v temnu.

Apocynin aktivovaný peroxidázou a peroxidem vodíku jsme připravili následujícím postupem: k 0,4 ml apocyninu 4 mmol.l⁻¹ jsme přidali 2 ml PBS, 3 jednotky HRP a 100 µl peroxidu vodíku 30 ppm. Po jednogodinové inkubaci jsme přidali 8 kU katalázy a směs jsme inkubovali 15 minut při 37 °C. Proteiny jsme denaturovali krátkým varem, po ochlazení jsme doplnili MEM bez fenolové červeně do výsledného objemu 4 ml a precipitát jsme odstranili centrifugací.

■ Stanovení produkce ROS

Ke stanovení produkce ROS intaktními buňkami jsme použili 2',7'-dichlorofluorescindiacetát. Tato fluorescenční sonda prochází plazmatickou membránou do cytoplazmy, kde je buněčnými esterázami deesterifikována na nepermeabilní 2',7'-dichlorofluorescin. DCFH je snadno oxidován ROS na fluoreskující DCF⁶;⁸⁻¹².

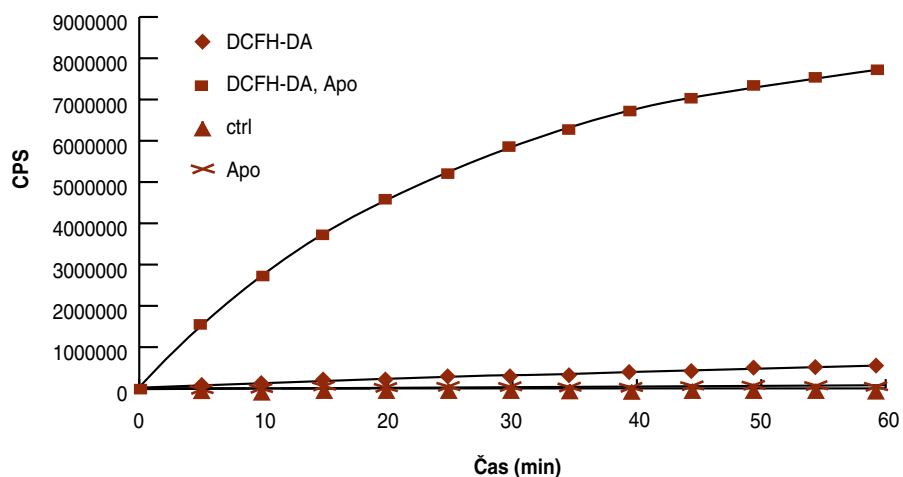
Fibroblasty nebo leukocyty byly resuspendovány v MEM bez fenolové červeně s 10 µmol.l⁻¹ DCFH-DA. Po 30minutové inkubaci při 37 °C byly promyty v MEM bez fenolové červeně a 5.10⁴ buněk.ml⁻¹ bylo resuspendováno ve stejném médiu spolu s apocyninem, jednotlivými inhibitory a v případě leukocytů s STZ (1 mg.ml⁻¹). Fluorescenci jsme měřili pomocí spektrofluorimetru FluoroMax 3 (Jobin-Yvon) 1 hodinu po 2,5 minutách při excitační vlnové délce 501 nm, štěrbíně 5 nm a emisní vlnové délce 521 nm, štěrbíně 5 nm při 37 °C. Vzorokly byly po celou dobu měření mírně promíchávány.



Obr. 1.:
Apocynin (4-hydroxy-3-metoxiacetofenon)

Obr. 2.: Vliv apocyninu na produkci superoxidu fibroblasty cévní stěny.

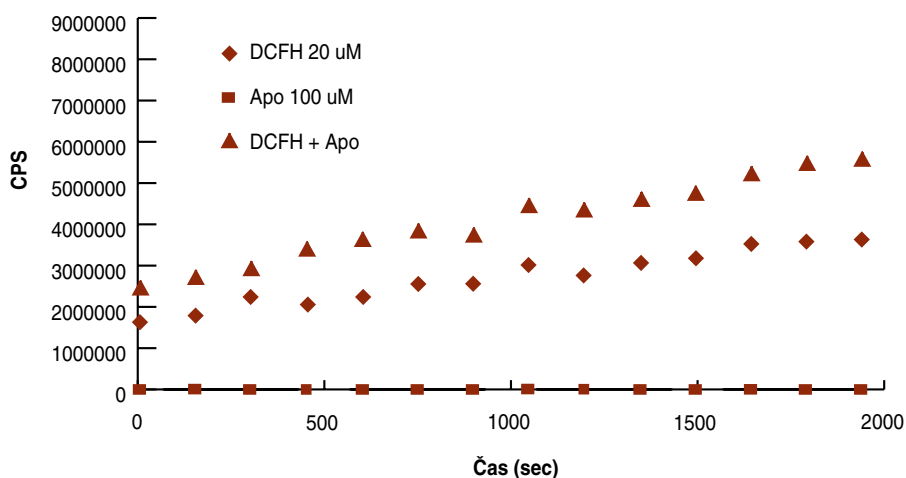
Suspenze fibroblastů cévní stěny (konečná koncentrace $5 \cdot 10^4$ buněk.ml⁻¹) byla rozdělena na dvě části. Polovina byla 30 minut inkubována s $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ DCFH-DA při 37 °C, druhá část ponechána jako kontrola. Po promytí MEM bez fenolové červeně byla každá část suspenze opět rozdělena na dva díly, k jednomu byl na začátku měření přidán apocynin $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$, druhý ponechán jako kontrolní. Fluorescence je vyjádřena jako počet pulsů za sekundu (CPS).



Obr. 3.:

Vliv apocyninu na fluorescenci DCFH.

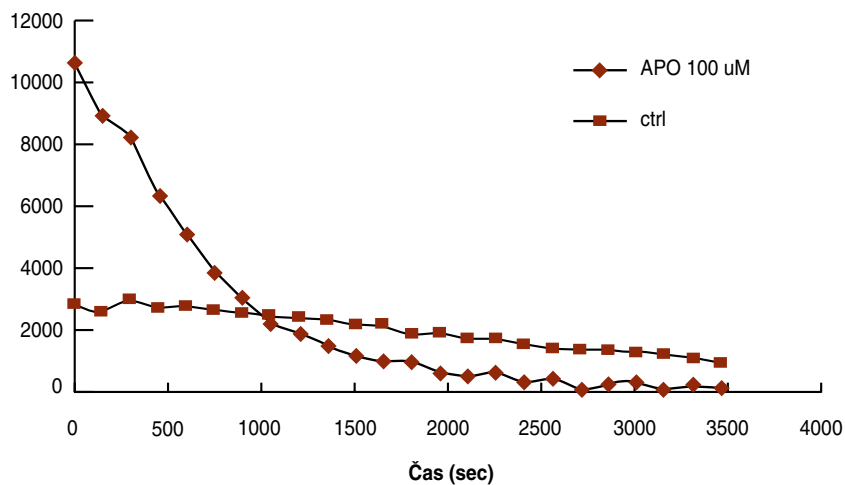
Fluorescence $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ deesterifikovaného 2',7'-dichlorofluorescinu, $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ apocyninu a jejich směsi.



Obr. 4.:

Vliv apocyninu na oxidaci DCFH-DA makrofágy stimulovanými STZ

Rychlost tvorby ROS makrofágy stimulovanými 1 mg.ml^{-1} STZ v přítomnosti $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ apocyninu.



■ Výsledky a diskuse

Apocynin zvýšil fluorescenci fibroblastů cévní stěny ošetřených DCFH-DA oproti kontrole (Obr. 2). Přítom u buněk, které nebyly ošetřeny DCFH-DA, nevedl apocynin ke vzestupu fluorescence. Fluorescence tak nemohla být způsobena samotnou přítomností apocyninu nebo tvorbou nějakého fluoreskujícího metabolitu apocyninu.

V bezbuněčném systému neměl apocynin významný vliv na vzestup fluorescence DCFH deesterifikovaného *in vitro* (Obr. 3). Apocynin tedy nezpůsoboval zvýšení fluorescence DCFH ani přímou interakcí s touto sondou. Zvýšení fluorescence po přidání apocyninu tak muselo být způsobeno zvýšením produkce reaktivních forem kyslíku buňkami.

Apocynin v koncentraci $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ zvýšil v první fázi produkci ROS makrofágy stimulovanými STZ. Rychlost tvorby ROS se však poměrně rychle snižovala, až po 15 minutách byla nižší než produkce ROS makrofágy bez přítomnosti apocyninu (Obr. 4). Přidání čerstvého apocyninu vedlo opět ke vzestupu produkce ROS (data nejsou uvedena); snížení rychlosti produkce ROS tedy nemohlo být způsobeno dosažením detekčního limitu DCFH nebo vyčerpáním schopnosti makrofágů tvořit ROS.

Apocynin aktivovaný peroxidázou z křenu a peroxidem vodíku bezprostředně inhiboval oxidaci DCFH-DA fibroblastů cévní stěny (Obr. 5) i makrofágy a granulocyty stimulovanými STZ.

Tiron, specifický permeabilní vychytávač superoxidu, prakticky zcela blokoval vliv apocyninu na oxidaci DCFH-DA fibroblastů cévní stěny (Obr. 6). Rovněž superoxidodismutáza a kataláza alespoň částečně snížily stimulační účinek apocyninu na oxidaci DCFH-DA (Obr. 7).

Stimulační účinek apocyninu na produkci ROS fibroblastů cévní stěny byl výrazně potlačen i difenyljenjodinem (Obr. 8). DPI je inhibitor flavinových enzymů, který nemá scavengerové účinky¹³. Experimentálně se DPI široce používá jako inhibitor NADPH oxidázy^{4;14;15}.

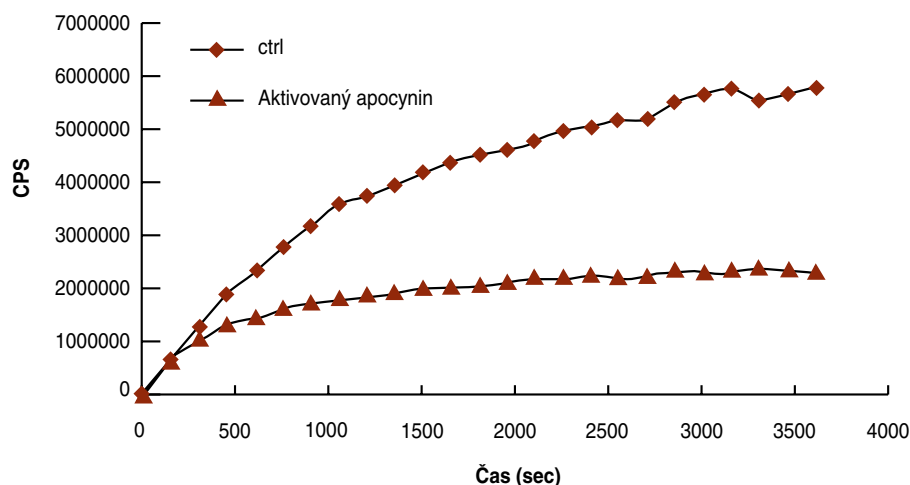
Lze shrnout, že apocynin stimuloval produkci reaktivních forem kyslíku, pravděpodobně superoxidu, fibroblastů cévní stěny. Systém produkující ROS bylo možné inhibovat difenyljenjodinem. Fagocytární buňky byly apocyninem nejprve stimulovány k vyšší produkci ROS, po této úvodní fázi však byl apocynin konvertován pravděpodobně myeloperoxidázou a peroxidem vodíku na jinou sloučeninu, která měla naopak inhibiční efekt na produkci ROS. Apocynin předem aktivovaný myeloperoxidázou a peroxidem vodíku *in vitro* měl bezprostřední inhibiční efekt na produkci ROS fagocytárními i nefagocytárními buňkami.

Schopnost apocyninu inhibovat produkci ROS až po preaktivaci peroxidázou a peroxidem vodíku by mohla být farmakologicky významná: apocynin je aktivován jen v místě zánětu, kde je v dostatečném množství přítomna jak volná leukocytární myeloperoxidáza, tak peroxid vodíku, a zde může působit jako protizánětlivá látka. Na imunitně nestimulované fagocyty přítomné nemá inhibiční účinek.

Otázkou zůstává význam zvýšení produkce ROS působením apocyninu. Intracelulární ROS mají signální funkci, spojenou především s účinkem růstových faktorů¹⁴⁻²⁹. Apocynin by tak mohl kromě protizánětlivého působení ve smyslu potlačení produkce mikrobicidních, ale i cytotoxických látek, zároveň i podporovat i buněčnou proliferaci a reparaci poškozené tkáně.

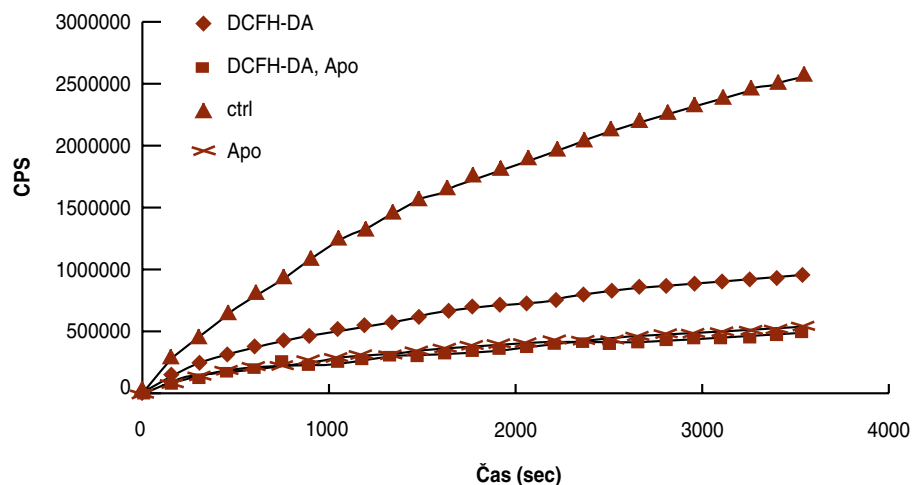
Obr. 5.:

Vliv apocyninu aktivovaného peroxidázou z křenu a peroxidem vodíku na produkci ROS fibroblastů cévní stěny. Oxidace DCFH-DA fibroblastů cévní stěny po přidání $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ apocyninu aktivovaného peroxidázou z křenu a peroxidem vodíku.



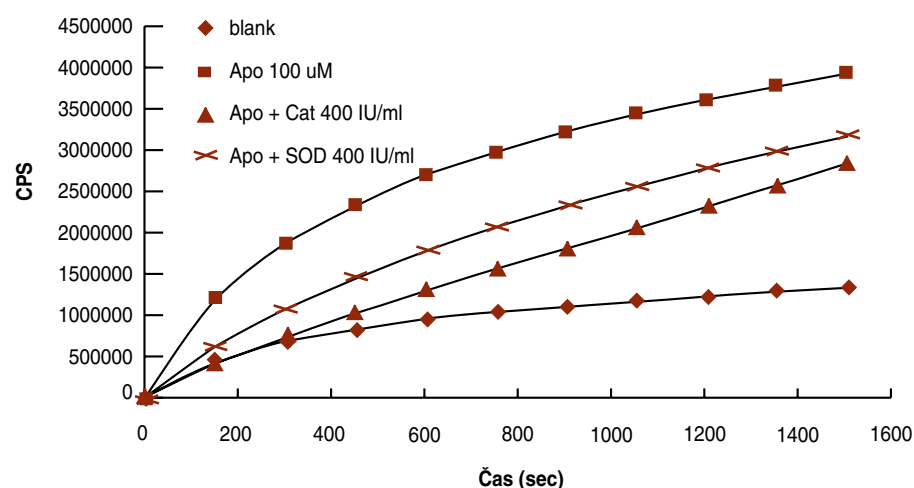
Obr. 6.:

Vliv apocyninu a tironu na oxidaci DCFH-DA fibroblasty cévní stěny.



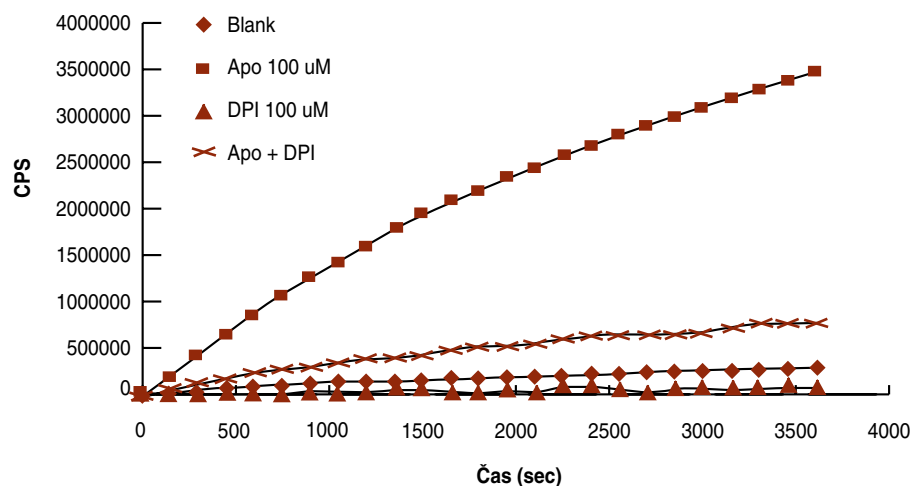
Obr. 7.:

Vliv apocyninu, katalázy a superoxiddismutázy na oxidaci DCFH-DA fibroblasty cévní stěny.



Obr. 8.:

Vliv apocyninu a difenyljenjodinia na oxidaci DCFH-DA fibroblasty cévní stěny.



LITERATURA

1. C. K. Atal, M. L. Sharma, A. Kaul, A. Khajuria: Immunomodulating agents of plant origin. I: Preliminary screening. *J. Ethnopharmacol.* 18: 133-141, 1986
2. J. M. Simons, B. A. Hart, Ip Vai Ching TR, H. Van Dijk, R. P. Labadie: Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 251-258, 1990
3. J. W. Meyer, M. E. Schmitt: A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett.* 472: 1-4, 2000

4. O. Dodd, D. B. Pearse: *Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279: H303-H312, 2000
5. J. Stolk, T. J. Hiltermann, J. H. Dijkman, A. J. Verhoeven: *Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11: 95-102, 1994
6. J. A. Holland, R. W. O'Donnell, M. M. Chang, D. K. Johnson, L. M. Ziegler: *Endothelial cell oxidant production: effect of NADPH oxidase inhibitors. Endothelium* 7: 109-119, 2000
7. P. J. Pagano, J. K. Clark, M. E. Cifuentes-Pagano, S. M. Clark, G. M. Callis, M. T. Quinn: *Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94: 14483-14488, 1997
8. C. P. LeBel, S. C. Bondy: *Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. Neurochem. Int.* 17: 435-440, 1990
9. S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, D. A. Wessels, D. M. Flaherty: *Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. Free Radic. Biol. Med.* 27: 146-159, 1999
10. I. D. Trayner, A. P. Rayner, G. E. Freeman, F. Farzaneh: *Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H2R123). J. Immunol. Methods* 186: 275-284, 1995
11. S. W. Kang, H. Z. Chae, M. S. Seo, K. Kim, I. C. Baines, S. G. Rhee: *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . J. Biol. Chem.* 273: 6297-6302, 1998
12. W. Hiraoka, N. Vazquez, W. Nieves-Neira, S. J. Chanock, Y. Pommier: *Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. J. Clin. Invest* 102: 1961-1968, 1998
13. B. V. O'Donnell, D. G. Tew, O. T. Jones, P. J. England: *Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. Biochem. J.* 290 (Pt 1): 41-49, 1993
14. K. K. Griendling, M. Ushio-Fukai: *Redox control of vascular smooth muscle proliferation. J. Lab Clin. Med.* 132: 9-15, 1998
15. K. K. Griendling, C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, R. W. Alexander: *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. Circ. Res.* 74: 1141-1148, 1994
16. B. M. Babior: *NADPH oxidase: an update. Blood* 93: 1464-1476, 1999
17. T. Finkel: *Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. J. Leukoc. Biol.* 65: 337-340, 1999
18. T. Joneson, D. Bar-Sagi: *A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. J. Biol. Chem.* 273: 17991-17994, 1998
19. J. H. W. Leusen, A. J. Verhoeven, D. Roos: *Interactions between the components of the human NADPH oxidase: A review about the intrigues in the phox family. Front Biosci.* 1: d72-d90, 1996
20. M. Sundaresan, Yu ZX, V. J. Ferrans, K. Irani, T. Finkel: *Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. Science* 270: 296-299, 1995
21. Y. J. Suzuki, H. J. Forman, A. Sevanian: *Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic. Biol. Med.* 22: 269-285, 1997
22. C. K. Sen, L. Packer: *Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J.* 10: 709-720, 1996
23. R. H. Burdon: *Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radic. Biol. Med.* 18: 775-794, 1995
24. R. Schreck and P. A. Bauerle: *A role for oxygen radicals as second messengers. Trends in cell biol.* 1, 39-42. 1991.
RefType: Generic
25. L. Flohe, R. Brigelius-Flohe, C. Saliou, M. G. Traber, L. Packer: *Redox regulation of NF- κ B activation. Free Radic. Biol. Med.* 22: 1115-1126, 1997
26. M. Liao, Z. Zhou, E. M. Wilson: *Redox-dependent DNA binding of the purified androgen receptor: evidence for disulfide-linked androgen receptor dimers. Biochemistry* 38: 9718-9727, 1999
27. Y. S. Bae, S. W. Kang, M. S. Seo, I. C. Baines, E. Tekle, P. B. Chock, S. G. Rhee SG: *Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem.* 272: 217-221, 1997
28. M. E. Ginn-Pease, R. L. Whisler: *Redox signals and NF- κ B activation in T cells. Free Radic. Biol. Med.* 25: 346-361, 1998
29. R. Gopalakrishna, W. B. Anderson: *Reversible oxidative activation and inactivation of protein kinase C by the mitogen/tumor promoter periodate. Arch. Biochem. Biophys.* 285: 382-387, 1991.



2. místo

MUTATION ANALYSIS IN CZECH PATIENTS WITH PORPHYRIA VARIEGATA

Autoři: E. Maloňová, R. Rosipal, J. Zeman, P. Martásek

Školitel: doc. MUDr. Pavel Martásek, DrSc. - Center for Integrated Genomics, Department of Pediatrics, Charles University in Prague - First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital

Introduction

Porphyria variegata (VP) is an autosomal dominant acute hepatic porphyria resulting from reduced activity of protoporphyrinogen oxidase (PPO), the 7th enzyme of hem synthetic pathway (Figure 1) (Brenner, 1980). It is characterized by intermittent acute attacks of neurological dysfunction with abdominal pain, hypertension, tachycardia, and peripheral neuropathy. Skin photosensitivity may be also present. The patients with clinical manifestation show a typical plasma fluorescence at 626 nm with excitation wavelength of 405 nm (Figure 2) (Da Silva, 1995), have increased fecal porphyrins and, during acute attacks, have increased porphyrin precursors in urine (ALA, PBG). The activity of PPO in nucleated cells in heterozygous patients is about 50%. (Deybach, 1981). The penetrance of the disease is low but a life-threatening attack can be provoked by factors such as drugs, alcohol or fasting (Kappas, 1995). Asymptomatic carriers are rarely detected by measurements of urinary ALA and PBG, faecal porphyrines or plasma fluorescence which are often within the normal range. Molecular analysis of family members of patients with PV provide exact diagnosis and thereby help to prevent manifestation of the disease. The human PPO cDNA and gene have been cloned and mapped to chromosome 1q22-23. The gene spans about 5 kb, contains 13 exons, the cDNA encodes a protein of 477 amino acids (Nishimura, 1995).

Figure 1.: Hem biosynthetic pathway

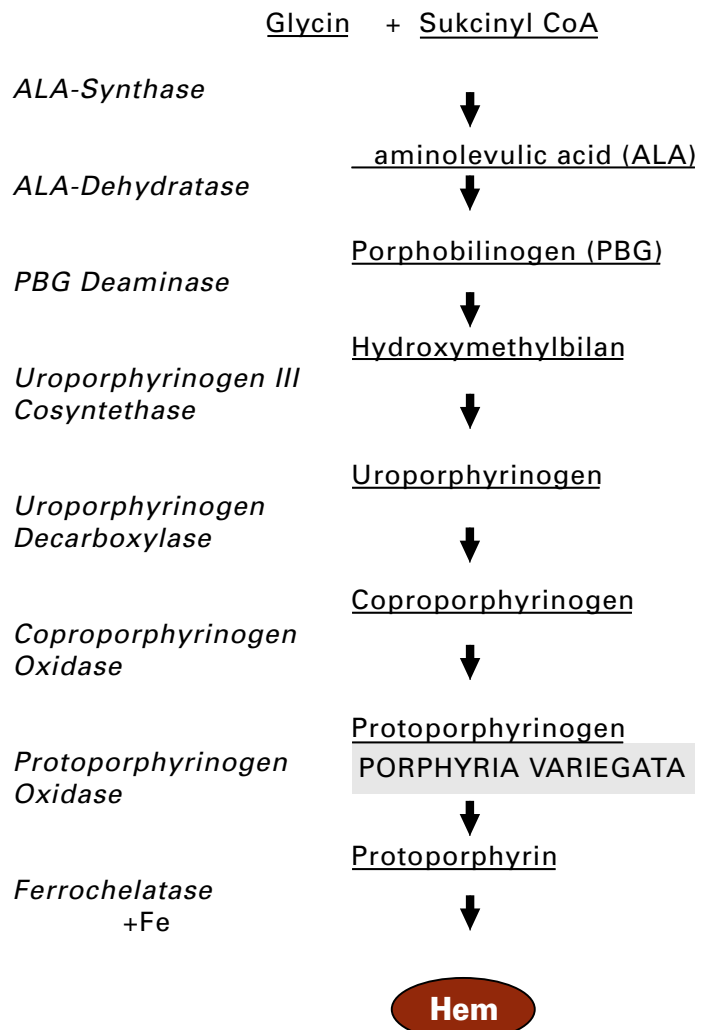
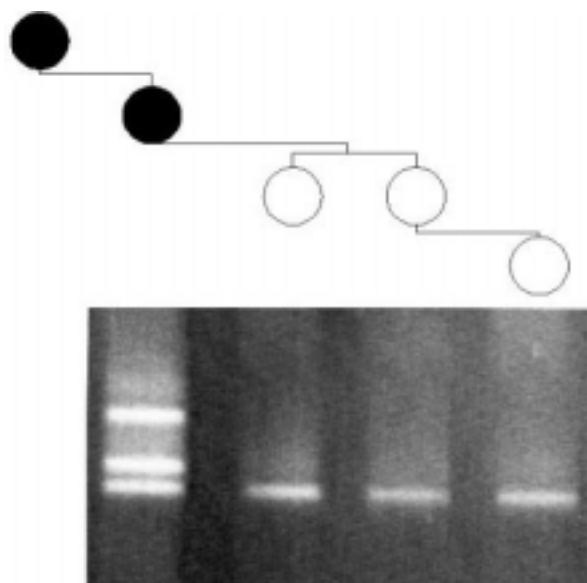


Figure 2.: Plasma of patients with porphyria variegata shows typical fluorescence in 626 nm



Figure 3.: DGGE of exon 11 protoporphyrinogen oxidase gene from family number 1



Methods

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using standard procedures. The patients DNA was screened for the presence of mutations by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Figure 3), or heteroduplex analysis (MDE) of all 13 exons and exon/intron boundaries. Exons with pathologic migration profiles on DGGE or MDE were analyzed by direct sequencing.

The cDNA coding human PPO was expressed in *E. coli* using

the pGEX 2T vector (Pharmacia), the PPO was expressed as a fusion protein with glutathion S transferase. Missense mutations were introduced into PPO by site direct mutagenesis (Stratagene). The entire sequences of the mutated plasmids were verified by sequencing of whole inserted cDNAs. Two independent clones from each mutation were prepared. The assay of wild type and mutated PPO in lysates of overnight bacterial cultures was performed as described previously (Deybach, 1985). At least four independent activity measurements were performed.

Results

We found mutations in all 6 families with previously clinically and biochemically diagnosed PV. (Table 1) Four new mutations were detected: one deletion (1393 del 8 bp), two missense mutations (W227G, C459Y) and one splicing mutation (IVS 6+1 G→A). Although the relationship is not known, the deletion 1393 del 8 bp was identified in two of these families. The pathological significance of missense mutations was confirmed by their expression in prokaryotic system, both missense mutations resulted in the absence of PPO activity (table 2).

Discussion and conclusion

In this systematic study we present an analysis of PPO gene defects in six Czech families with porphyria variegata. In all families we found the pathognomic mutations. The consequent molecular analysis was performed in all family members and thus asymptomatic carriers of mutations were identified.

The cDNAs PPO containing two novel missense mutations were prepared and expressed in *E. coli*. The absence of PPO activity of identified missense mutations was in agreement with their expected 50% activity in the heterozygous state and confirmed their pathological significance. We intend to further characterize these mutated clones.

Table 1.: Mutations in protoporphyrinogen oxidase gene found in Czech patients with porphyria variegata

Family	Exon/intron localization	Mutation	Predicted effect on amino acid sequence
1	exon 11	del G 1177	
2	exon 7	679 T→G	W 227 G
3	exon 13	del 8 bp3308-3315	
4	intron 6	IV 6+1 G→A	
5	exon 13	del 8 bp3308-3315	
6	exon 13	5371 G→A	C 459 Y

Table 2.: Activities of mutated PPO expressed in E. coli

cDNA	Mean (SEM) (nmol/mg protein/hour)	Range	Percentage
pGEX 2T	44 ± 0,4	3,6 - 5,3	
human PPO	102,2 ± 8,8	90,3 - 128,0	100
W227G	3,7 ± 0,1	3,3 - 4,0	0
C459Y	3,6 ± 0,2	3,3 - 4,0	0

Acknowledgments

This work was supported by grants GAUK 5/00/c and Barrande 2002-041-1

REFERENCES

1. V. Da Silva et al., *Clin Chim Acta* 1995; 238:163-168
2. A. Brenner et al, *Engl J Med* 1980; 302: 765-769
3. J. C. Deybach et al, *Hum Genet.* 1981; 58:425-8
4. J. C. Deybach et al., *Eur J Biochem* 1985; 149: 431-435
5. A. Kappas et al, In Scriver CR: *The metabolic basis of inherited diseases*, 7th edition, 1995: 2103-2159
6. K. Nishimura et al., *J Biol Chem.*1995; 270: 8067-8080



3. místo

LAMINS A/C ARE NOT ESSENTIAL FOR SPECKLE MORPHOLOGY



Jaromíra Večeřová

Autoři: Jaromíra Večeřová, Karel Koberna, Jan Malínský, Ivan Raška
 - Institute of Experimental Medicine, AV CR, Prague, Czech Republic and Laboratory of Gene Expression, Charles University, 1st Medical Faculty, Prague, Czech Republic,
 Tom Misteli - National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, USA)

Školitel: prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc. - Institute of Experimental Medicine, AV CR, Prague, Czech Republic and Laboratory of Gene Expression, Charles University in Prague - First Faculty of Medicine, Czech Republic

■ Nuclear lamins are the major component of the nuclear lamina, but also play an important role in the functional organization of the interior of the cell nucleus. We have tested whether lamin A/C contributes to the organization of pre-mRNA splicing factor compartments. Using lamin A/C negative mouse embryonic fibroblasts we show that loss of lamin A/C has no significant effect on the distribution of several pre-mRNA splicing factors and does not affect speckle morphology as examined by light and electron microscopy. Time-lapse microscopy suggests that the dynamic properties of speckles are unchanged upon loss of lamin A/C and FRAP analysis demonstrates that the mobility of SF2 splicing factor is the same in lamin A/C positive and negative cells. Furthermore, speckles persist after nuclear matrix preparation both in lamin positive and negative cell lines. These results demonstrate that lamins A/C are not essential for speckle morphology.





Cena zdravotnických novin
byla udělena studentu 6. ročníku

Jiřímu Klempířovi

za práci

“Huntingtonova nemoc: analýza vztahů mezi klinickými
projevy, anamnestickými daty a výsledky pomocných
vyšetřovacích metod“.

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA DĚKUJE SPONZORŮM KONFERENCE



Johnson & Johnson



ZDN.cz
ZDRAVOTNICKÉ
NOVINY



Zpracovalo Odd. vnějších vztahů UK v Praze - 1. LF
Ilustrace a návrh obálky ak. mal. Ivan Helekal
Grafická úprava, sazba a litografie:
PM reklamní a hudební agentura

