

5. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE



KONANÁ DNE 24. KVĚTNA 2004
POD ZÁŠTITOU DĚKANA 1. LF
Prof. MUDr. Štěpána Svačiny. DrSc., MBA

OBSAH

Obsah	2
Slovo úvodem	3
Pozvánka	4
Seznam účastníků	5
Hodnotitelská komise	6
ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ	7
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST	8
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST	16
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY	24
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY	36
VÍTĚZNÉ PRÁCE - IN EXTENSO	43
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – Teoretická část	44
Vliv neurotrophinů a jejich receptorů na vývoj Paciniho tělísek – Jiří Šedý	45
Asociace exprese genu MRP5 se vznikem rezistence k 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurinu v modelu hematologické malignity – Michal Zápotocký	49
Analýza mutace 3819del5 genu BRCA1 v české populaci – Ondřej Havránek	52
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – Klinická část	57
Intracellular cytokines in progressive multiple sclerosis treated with pulse cyclophosphamide – Eva Krasulová, Ivana Kovářová, Eva Havrdová	57
Diagnostický význam stanovení protilátek proti fosfolipidům – Zdenka Vaňková	61
Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění a polymorfismus apolipoproteinu E v Mongolsku ve srovnání s českou populací – Filip Kučera	66
Smyková rychlost v přírodní tepně dialyzačního cévního přístupu u diabetiků – Vladimír Tuka, Jan Malík, Jana Rotreklová	71
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ - přednášky	75
Caenorhabditis elegans has only one a-galactosidase and a-N acetylgalactosaminidase ortholog – MUDr. Jakub Sikora, Ing. Jana Hujová, Mgr. Robert Dobrovolný, Bc. Dana Holanová	77
Porucha cytochrom c oxidázy u dívky s fenotypem Werdnig-Hoffmanovy nemoci a novou mutací 1518delA ve SCO2 genu – K. Veselá, H. Hansíková, M. Elleder a J. Zeman	78
Imunohistochemické markery pro detekci apoptózy primárních potkaních hepatocytů – Tomáš Kučera, Nikolína Canová	81
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – Postery	87
Originální příprava imunoafinitních nosičů pomocí afinitní sorpce na imobilizovaných kovových iontech – Mgr. Eva Zatloukalová	87
Porovnání jednotlivých mikropreparačních technik při léčbě časné kariézní léze – MUDr. Martin Mikšovský	88
Mutační analýza v genu pro apoprotein B u české populace obézních dětí a osob s diagnózou ischemické choroby srdeční – Helena Svobodová, Ivan Mazura, Michal Vrablík, Richard Češka	90
CENA ZDRAVOTNICKÝCH NOVIN	94
Analýza mutace 3819del5 genu BRCA1 v české populaci – Ondřej Havránek	95

Dne 24. Května 2004 proběhl již 5. ročník obnovené Studentské vědecké konference na Univerzitě Karlově v Praze - 1. lékařské fakultě. Při pohledu na kvalitu přednesených prací jsme rádi, že jsme se k tradici prezentace vědeckých prací studentů na studentské vědecké konferenci vrátili.

Poroty měly těžký úkol při vybírání oceněných, ale myslím, že v konkurenci mnoha prací rozhodly velmi dobře. Všem oceněným blahopřeji a jsem rád, že bylo možné je představit členům Vědecké rady 1. LF na jejím červnovém zasedání.

Velmi si vážím vysoké úrovně prací pregraduálních studentů a začínajících doktorandů. Trochu méně mne těší prezentace doktorandů čtvrtých a vyšších ročníků. Tito studenti by měli vystupovat běžně na českých lékařských sjezdech a dokonce ti nejlepší i na sjezdech zahraničních. Jejich účast na studentské konferenci má však určitý smysl v tom, že mladší studenti vidí, na jakou úroveň by měla jejich práce dospět.

Je mně ale známo, že dokonce někteří pregraduální studenti přednesli v tomto roce svá sdělení také na celostátních lékařských sjezdech. V situaci, kdy se diskutuje o tom, že kvalita zájemců o studium medicíny klesá mne tato skutečnost těší dvojnásobně

Naučit studenta tvůrčí vědecké práci je v jistém smyslu vyvrcholením činnosti naší fakulty. Tato činnost studentů se odehrává v problematických ekonomických podmínkách. Představa, že před námi stojí lidé, kteří většinou zadarmo či za směšnou částku stipendia dokázali kvalitně vědecky pracovat a zároveň obhájit vynikající vědecké práce, je z mnoha hledisek neuvěřitelná.

Musím poděkovat studentům pregraduálním i postgraduálním, že často ve složitých podmínkách drží kvalitu vědecké práce na naší fakultě vysoko.

Všichni současní vedoucí pracovníci fakulty vzpomínají na své vědecké začátky v době studia. Je tedy jisté, že i nyní před námi stojí ti, ze kterých postupně vzniká generace nových asistentů, docentů, profesorů naší fakulty, nezátížená již dobou totality. Domnívám se, že právě v tom je velká naděje naší fakulty i celé univerzity.

*prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA
děkan 1. lékařské fakulty*



Již 5. ročník studentské vědecké konference zahájil tradičně děkan Univerzity Karlovy v Praze – 1. LF prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA společně s proděkanem pro vědeckou práci a výzkum prof. MUDr. Vladimírem Tesařem, DrSc., MBA.

5. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

1. lékařské fakulty

konaná pod záštitou děkana 1. LF

Prof. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc., MBA

24. KVĚTNA 2004

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

5. studentskou vědeckou konferenci na 1. LF UK zahájí děkan 1. lékařské fakulty prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA dne 24. května 2004 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 24. května 2004, 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 24. května 2004 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 a postery (rozměr 160x120 cm).

Účastníky konference žádáme, aby si přinesli svůj osobní notebook.

K pozvánce bude přiložen časový harmonogram jednotlivých vystoupení.

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

Prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA
děkan 1. lékařské fakulty

Veškeré informace o konání 5. SVK:
Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky 1. LF
Tatiana Králová, tel. 22496 4358
e-mail: tkral@lf1.cuni.cz

SEKCE PREGRADUÁLNÍ TEORETICKÁ ČÁST

- Akando Benoit, 5.r.
- Ballay Rastislav, 3.r.
- Grega Marek, 3.r.
- Havránek Ondřej, 3.r.
- Hrubá Markéta, 4.r.
- Hybel'ová Mária, 4.r.
- Melicherčík Pavel, 3.r.
- Nováková Martina, 3.r.
- Porazíková Karolína, 3.r.
- Richterová Sabina, 5.r.
- Riljak Vladimír, 6.r.
- Říha Pavel, 4.r.
- Šedý Jiří, 6.r.
- Zápotocký Michal, 5.r.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ KLINICKÁ ČÁST

- Darsová Denisa, 5.r.
- Ingrischová Michaela, 5.r.
- Hriňová Petra, 5.r.
- Hůdková Daniela, 5.r.
- Krasulová Eva, 6.r.
- Křemen Jaromír, 6.r.
- Kučera Filip, 5.r.
- Rotreklová Jana, 5.r.
- Skalická Hana, 5.r.
- Sulek Štěpán, 3.r.
- Tuka Vladimír, 5.r.
- Vaňková Zdeňka, 6.r.
- Walker D Nolan, 6.r.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY

- Böhm Marek, MUDr.
- Dobrovolný Robert, Mgr.
- Fikáčková Hana, MUDr.
- Hořejší Magdaléna, MUDr.
- Hujová Jana, Ing.
- Hyánek Tomáš, MUDr.
- Chachkhiani Ivane, MUDr.
- Chovanec Martin, MUDr.
- Janatová Markéta, Mgr.
- Keslová Jana, Mgr.
- Kučera Tomáš, MUDr.
- Ligasová Anna, Mgr.
- Linková Lucie, MUDr.
- Mikula Ivan, Ing.
- Pavlišta David, MUDr.
- Pešina Jiří, MUDr.
- Podzimek Štěpán, Mgr.
- Trča Stanislav, MUDr.
- Sikora Jakub, MUDr.
- Stibůrek Lukáš, Mgr.
- Velenovská Marie, MUDr.
- Veselá Kateřina, Ing.
- Záhoráková Daniela, Mgr.
- Zikán Michal, MUDr.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ POSTERY

- Hrubý Tomáš, MUDr.
- Mikšovský Martin, MUDr.
- Doležal Ondřej, MUDr.
- Fialová Markéta, Mgr.
- Frýdlová Jana, Mgr.
- Teuberová – Havlová Zuzana, MUDr.
- Kasperová Martina, MUDr.
- Milotová Martina, Mgr.
- Novotná Lenka, Mgr.
- Seydlová Michaela, MUDr.
- Svobodová Helena, Mgr.
- Šimůnek Petr, MUDr.
- Trnečková Lenka, Mgr.
- Zatloukalová Eva, Mgr.

**HODNOTITELSKÉ KOMISE 5. STUDENTSKÉ VĚDECKÉ KONFERENCE
UK V PRAZE 1. LF KONANÉ DNE 24. 5. 2004**

SEKCE PREGRADUÁLNÍ

Teoretická část

Předseda: Prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.
Členové: Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.
Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.
Doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.

Klinická část

Předseda: Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc., MBA
Člen: Doc. MUDr. Miroslav Merta, CSc.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ

Předseda: Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
Členové: Prof. RNDr. František Víttek, DrSc.
Doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST

- Akando Benoit, 5.r.
- Ballay Rastislav, 3.r.
- Grega Marek, 3.r.
- Havránek Ondřej, 3.r.
- Hrubá Markéta, 4.r.
- Hybeřová Mária, 4.r.
- Melicherčík Pavel, 3.r.
- Nováková Martina, 3.r.
- Porazíková Karolína, 3.r.
- Richterová Sabina, 5.r.
- Riljak Vladimír, 6.r.
- Říha Pavel, 4.r.
- Šedý Jiří, 6.r.
- Zápotocký Michal, 5.r.

Hodnotilelská komise

Předseda: Prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.

Členové: Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.
Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.
Doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.



THE USE OF CD38+ ANTIGEN EXPRESSION ON CD8+ T- LYMPHOCYTES AS A MARKER OF HIV-1 INFECTION.

Author: AKANDO Benoit, 5. r.

Advisor: MUDr. Michal Holub, Ph.D., Laboratory of Infectious Immunology 3rd Department of Infectious and Tropical Diseases, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Introduction: persistent viraemia and progressive decline in number of T-lymphocytes characterize HIV infection. Also, human immunodeficiency virus (HIV)-1 is responsible for chronic immune activation that may partly cause the decrease in CD4+ T- cells. The aim of this study was to evaluate an association between expression of activation markers CD28 and CD38 on CD8+ T- lymphocytes and other routine laboratory parameters of HIV-1 infection such as CD4+ count and viral load of HIV-1 RNA.

Methods: we analyzed expression of CD28 and CD38 antigens on CD8+ T-lymphocytes in 10 newly diagnosed HIV+ persons. Also, we compared these data with results obtained in previous study in 16 HIV-positive patients treated with highly active antiretroviral therapy (HAART) and healthy controls (n=19). The percentage of CD8 T-lymphocytes with CD28 and CD38 expression was determined with three-color cytometric analysis.

TABLE 1: CORRELATION BETWEEN EXPRESSIONS OF ACTIVATION MARKERS CD28+ ON CD8+ T- LYMPHOCYTES AND VIRAL LOAD. DATA ARE PRESENTED AS MEAN ± STANDARD ERROR * $P < 0.01$.

Subpopulations	CD4+ T-cells (%)	CD4+ T-cells (cells/mm ³)
CD8+/CD28+ T-cells (%)	$r = 0.918^*$	$r = 0.356$
CD8+/CD38+ T-cells (%)	$r = 0.842$	$r = -0.272$

TABLE 2: DIFFERENCES IN HIV-1 RNA PLASMA VIRAL LOAD, PERCENTAGES OF CD4+ T-LYMPHOCYTES AND CD8+/ CD38+ T-LYMPHOCYTES. * $P < 0.01$ (DIFFERENCE BETWEEN NEWLY DIAGNOSED AND HAART TREATED HIV-POSITIVE PATIENTS).

Parameters	Controls	Newly diagnosed HIV+ patients	HIV+ patients (after 12months of HAART)
Viral load (log (copies/ ml))	0	2.7 ± 0.8	2.6 ± 0.6
CD8+/ CD38+ T-cells (%)	46.6 ± 2.1	$68.4 \pm 5.3^*$	46.1 ± 3.7
CD4+ T-cells (%)	41.8 ± 10.4	20 ± 3.1	24 ± 1.7

Results:

Conclusion: although number of treatment naïve patients in our study is small, we can assume that HAART limits the chronic activation of the immune system in majority of HIV-infected persons. Moreover, the negative correlation between activation of CD8+ T-lymphocytes (cytotoxic T-lymphocytes - CTL) as evidenced by a decline of CD28 antigen expression (activated cells are losing CD28 antigen from their surface) and percentage of CD4+ T-lymphocytes indicates that CTLs' play a role in the destruction of CD4+ T-lymphocytes.

MOLECULAR NATURE OF PARADOXICAL HEART RATE INCREASE AFTER APPLICATION OF CARBACHOL IN DEVELOPING CHICK EMBRYO

Author: Rastislav Ballay, 3. r.

Advisor: Jaromír Mysliveček, Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

We have used the chick embryos of white Leghorn to study the changes of heart rate (HR) after application of carbachol (muscarinic agonist) *in ovo*. Developing embryos from the day 13 *in ovo* to day 21 (hatching) were exposed to continual infusion of carbachol starting at the day 13. The solutions were applied from the osmosis-based apparatus to the papyraceous membrane. Embryos in 14th and 15th day *in ovo* were exposed to BIM (bisindolmaleimide). BIM is specific PKC (phosphokinase C) inhibitor and we applied gradient concentration of BIM. Embryonic HR was determined using acoustokardiogram method (ACG). ACG is non-invasive technique to record the pulsating pressure waves. ACG signals were sometimes distorted. For these purposes, we had to use spectral analysis (Fourier transform) to restore and calculate HR. Simultaneously, densities of muscarinic (MR) and β -adrenergic (BAR) receptors in chick heart ventricles were measured using radioligand binding of specific receptor antagonists with rapid filtration we detected the receptors. The ligands used were [³H]-quinuclidinyl benzilate for the MR and [³H]-CGP 12177 for the BAR.

Long-term exposure of carbachol increases the HR in days 13 to 15. From the day 16 carbachol had negative effect on HR compare to control. Infusion of BIM (days 14 and 15) increased HR. Application solution of carbachol with BIM potentiate the increase of HR. Densities of MR and BAR were balanced after carbachol treatment from the day 13 to day 21. There were no substantial changes in comparison to control.

We can therefore conclude that more than one mechanism are responsible for the HR and receptor regulation in the developing heart.

IZOLÁCIA, KULTIVÁCIA A IDENTIFIKÁCIA HLADKÝCH SVALOVÝCH BUNIEK AORTY LABORATÓRNEHO POTKANA

Autor: Marek Grega, 3. r.

Školiteľ: MUDr. Martin Vejražka, Ústav lekárskej biochemie 1. LF

Pre štúdium pôsobenia voľných radikálov na cievnú stenu je potrebné izolovať a kultivovať hladké svalové bunky (vascular smooth muscle cells, VSMC). Izolovali sme ich z aorty laboratórneho potkana kmeňa Wistar veku asi 4 týždne, hmotnosti do 120 g. Aortu sme sterilne odobrali, prepláchli kultivačným médiom DMEM a mechanicky očistili od okolitej vazivovej tkáňe. Adventiciu sme odstránili inkubáciou s roztokom kolagenázy. Ďalej sme aortu pozdĺžne rozstrihli a intimu odstránili ďalšou inkubáciou v kolagenáze. Nasledovalo enzymatické rozvolnenie buniek medie pomocou elastázy a kolagenázy. Bunky sme kultivovali v kultivačnom médiu DMEM.

Po dlhodobej kultivácii dochádza k zmenám v morfológii VSMC, bunky rýchlo strácajú svoj vretenovitý tvar. Pôvodný tvar si zachovávali dlhšie pokiaľ boli pestované na kultivačných nádobách potiahnutých tenkou vrstvou kolagénu. Vplyv na ich morfológiu malo tiež zloženie kultivačného média. Vretenovitý tvar ostával lepšie zachovaný pri použití média DMEM s prídavkom 10% fetálneho bovinného séra a ECGS (endothelial cell growth supplement, 30 mg/ml).

Pokiaľ sme dosiahli morfológicky stabilnú kultúru po dobu niekoľkých pasáží, testovali sme ich kontraktilitu po stimulácii noradrenalinom. Na jej preukázanie sme použili sklá potiahnuté filmom silikónovej gumeny, pod ktorou bola vrstva tekutého silikónového oleja. Bunky prisadnuté na takýto film vytvárali po podráždení noradrenalinom a následnej kontrakcii krásny viditeľný pod fázovým kontrastom v mikroskope.

Pri použití uvedených kultivačných podmienok sa nám podarilo udržať bunky morfológicky i funkčne odpovedajúce VSMC do deviatej pasáže.

ANALÝZA MUTACE 3819DEL5 GENU BRCA1 V ČESKÉ POPULACII

Autor: Ondřej Havránek, 3. r.

Školiteľ: MUDr. Michal Zikán, Ústav biochemie a experimentální onkologie 1.LF

Karcinom prsu je najčastejším zhoubným nádorom žien u nás, 5-10% vzniká na podklade vrodené mutácie. Asi 52 % mutácií je prítomno v genu BRCA1, ktorý je tak spolu s genom BRCA2 (32%) hlavným predispozičným genom. Mutácie v tomto genu výrazne zvyšuje riziko karcinomu prsu, kolem 80% ve věku do 70 let, a karcinomu ovaria, 40-60% do 70 let. Cílem práce je zhodnotit četnost mutace 3819del5 genu BRCA1 v české populaci žen s karcinomem prsu vzhledem k diagnostice genetických dispozicí.

Testováno bylo 500 pacientek s karcinomem prsu a 300 zdravých lidí. DNA byla amplifikována pomocí PCR a mutace detekována elektroforézou v agarosovém gelu. Rozdíl délky normální a mutované alely se projevil vznikem dvou fragmentů.

V testovaném souboru 500 pacientek s karcinomem prsu byla nalezena jedna mutace, v kontrolním souboru 300 lidí nebyla nalezena žádná. Podíl mutace 3819del5 na vzniku nádoru v populaci žen s karcinomem prsu je tedy přibližně 1:500. Pro přesnější odhad by bylo nutné otestovat mnohem větší soubor pacientů. Podle jiné studie je výskyt mutace 3819del5 mezi ostatními v BRCA1 genu 14%. Z toho by se dalo usuzovat na četnost mutace 3819del5 1:300 v populaci žen s karcinomem prsu. Z nálezu mutace u zdravé ženy vyplývá nutnost preventivní péče s několika možnostmi zásahu. Od precizního sledování po preventivní mastektomii.

Mutace 3819del5 je v české populaci jednou z nejčastějších mutací genu BRCA1. Je nutné se zamyslet, jaký význam by mělo vyšetřování všech pacientek s karcinomem prsu na přítomnost této a dalších častých mutací genu BRCA1, které by v případě testování konkrétních mutací bylo velice levné. Podmínkou ovšem je dostatečné množství zachycených mutací.

VLIV AKUTNÍHO A CHRONICKÉHO PODÁVÁNÍ AMFETAMINU NA CHOVÁNÍ POTKANŮ V MORRISOVĚ VODNÍM BLUDIŠTI

Autorky: Markéta Hrubá, 4. r. a Mária Hybelová, 4. r.

Školiteľ: Prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc. a Doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF a VFN

Amfetamin (AMF) je často zneužívaná návyková látka, ktorá môže mať odlišné behaviorálne účinky v závislosti na podanej dávke a chronicite jej užívania. Cílem této studie bylo testování účinku akutního a chronického podávání AMF na prostorovou paměť potkanů v Morrisově vodním bludišti. Použili jsme samce 3 kmenů potkanů, jmenovitě Wistar (Velaz, Praha), Sprague-Dawley a Lewis (Charles River Laboratories, Německo). Kmen Lewis vykazuje deficitní aktivitu hypothalamo-hypofyzární-nadledvinové osy. V Morrisově vodním bludišti byli potkani trénováni ve schopnosti nalezení neviditelné únikové plošiny. Sledovali jsme zejména dva parametry, a to latenci (doba dosažení únikové plošiny (s)) a vzdálenost uplavanou k dosažení plošiny (m). Za použití programu TRAM (poskytnut Dr. L. Neradem) bylo možné sledovat další parametry, jako jsou účinnost nalezení cesty, tortuosita, tigmotaxe aj. AMF (sulfát) byl aplikován i.p. jednorázově



v dávkách 1 nebo 8 mg/kg, a to 1 nebo 5 hodin před vlastním testem. Při chronickém podávání po dobu 14 dnů jsme používali dávku 4 mg/kg; poslední dávka byla 24 hodin před vlastním testem. U kmene Wistar se po dávce 1 mg/kg nepatrně snížila latence i vzdálenost potřebná k dosažení únikové plošiny. AMF v dávce 8 mg/kg vyvolal výrazné zhoršení výkonu u všech kmenů potkanů. Většina potkanů nenalezla cíl v limitu 60s, zůstávala převážně v jednom segmentu bludiště a pohybovala se po vnějším obvodu tohoto zařízení. Efekt AMF vymizel při testu provedeném za 5 hod po aplikaci látky. Chronické podávání AMF mělo jen malé účinky na prostorovou paměť: kmen Lewis, u kterého je učení pomalejší než u ostatních kmenů, zlepšil své výsledky v testu, u kmene Sprague-Dawley, který vykazoval rychlé učení, AMF výsledky neovlivnil, a u kmene Wistar došlo ke zhoršení výkonu po chronickém AMF. Závěrem lze shrnout, že vysoká dávka amfetaminu vyvolala nejen kvantitativní, ale i kvalitativní změny v prostorové paměti, jak dokumentujeme i filmovými záznamy. Tyto účinky však vymizí během 5 hodin po aplikaci amfetaminu.

Podporováno FRVŠ 2877/2003 a MSM 1111 0000 1

AKTUÁLNOST AUTOMOBILOVÝCH EMISÍ V TROPOSFÉŘE

Autor: Pavel Melicherčík, 3. r.

Školitelé: Doc. MUDr. Otakar Klein, CSc., Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN, Ing. Jana Ostatnická, Český hydrometeorologický ústav, Úsek ochrany čistoty ovzduší

V období 1990-1999 v ČR došlo k významnému poklesu koncentrací oxidu siřičitého a suspendovaných částic (TSP), které demonstrujeme v grafické podobě. Rychlý rozvoj automobilové dopravy v ČR má za následek nárůst emisí oxidů dusíku a sekundárně vznikajícího troposférického (přízemního) ozónu, který vzniká celou řadou chemických reakcí tzv. prekursorů (oxidy dusíku a těkavé organické látky) za účinku slunečního záření a spolupůsobení O_2 . Z tohoto důvodu jsou v současné době u nás, stejně jako v sousedních evropských zemích, považovány za nejvýznamnější látky znečišťující ovzduší oxidy dusíku (zejména oxid dusičitý), troposférický ozón a jemné suspendované částice 2,5 μm . Narůstá závažnost znečištění ovzduší benzenem. V naší práci předkládáme výsledky celoročního kontinuálního měření koncentrace benzenu na typické městské stanici (Praha - Smíchov) a příměstské stanici (Praha - Libuš) v závislosti na ročním období (zima, léto), pracovních dnech a dnech pracovního klidu. Předkládané výsledky (celoroční koncentrace benzenu v $\mu g/m^3$ dle měření ČHMÚ) ukazují závislost výše hladin koncentrací benzenu na ranních a odpoledních špičkách v zimním období (městská stanice Praha-Smíchov: 5,5-6,3 $\mu g/m^3$ a příměstské stanice Praha-Libuš: 2,3-3 $\mu g/m^3$). Závislost na ranních a odpoledních dopravních špičkách je méně výrazná u této příměstské stanice oproti středu města. Hodnoty celoročních koncentrací benzenu jsou podstatně nižší v příměstské stanici Libuš, než u městské stanice vlivem menšího automobilového provozu. Závislost rychlosti reakcí benzenu s OH radikály na ročním období se projevuje nižší koncentrací benzenu v přízemní atmosféře při letních bezoblačných podmínkách oproti oblačnému počasí v zimním období. Práce upozorňuje na nové výsledky výkladu mutagenního-karcinogenního účinku benzenu objevem několika typů metabolitů benzenu, které vyvolávají fenomén intracelulárního oxidačního stresu, zejména uvolněním radikálu oxidu dusnatého. Konstatujeme, že většina naměřených hodnot celoročních koncentrací benzenu v uvedených lokalitách se pohybuje pod hodnotou 5 $\mu g/m^3$, která je cílovou hodnotou imisního limitu pro benzen doporučenou evropskou komisí do roku 2010. Nutno však upozornit, že k této hodnotě celoročního průměru sledovaných koncentrací, budou vzaty i hodnoty krátkodobě překračující, které nabývají na závažnosti vzhledem k mnohahodinovému setrvávání benzenu v organismu po jeho expozici inhalací.

STRESS BRINGS ABOUT THE DIFFERENT CHANGES IN QUANTITIES OF LUNG MUSCARINIC, A_1 -ADRENERGIC AND B -ADRENERGIC RECEPTORS IN CRH KNOCKOUT MICE IN COMPARISON TO WILD TYPE MICE.

Autorky: Nováková Martina, 3. r. a Porážíková Karolína, 3. r.

Školitel: MUDr. Mysliveček Jaromír, Ph.D., Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Glucocorticoid hormones are essential in activation of the transcription of PNMT (phenylethanolamine N-methyltransferase), the enzyme that catalyse the biosynthesis of adrenaline. This is important in view of the roles which glucocorticoids play in the adaptation to stress. We investigated whether the immobilisation stress have an effect on the densities of muscarinic (MR) and of α_1 - (AAR) and β -adrenergic receptors (BAR) in the lungs of CRH (corticotropin releasing hormone) knockout mice (CRH KO). Lung tissue can serve as a model of tissue in which the effects of sympathetic neurotransmitters (i.e. adrenaline or noradrenaline) are antagonised by the effects of parasympathetic neurotransmitters. Therefore it is possible to suppose the existence of heterologous regulation between these receptor systems (adrenergic and muscarinic). Compounds [3H]quinclidinyl benzilate and [3H]CGP 12177, [3H]prazosin were utilised as specific markers of the muscarinic and adrenergic receptors, respectively.

The amount of receptor binding sites in CRH KO mice were decreased in comparison to their wild type counterparts. This decrease was the most prominent in AAR densities. The stress brings about profound decrease in MR, BAR and AAR both in wild type and knock-out animals. The changes in BAR densities brought by stress were more prominent in CRH KO animals. On the other hand, the changes in the densities of MR and AAR brought by stress were more noticeable in WT animals.

We can therefore conclude that: 1) CRH knock-out is able to change the densities of MR, AAR and BAR in the lung tissue; 2) stress reaction differs in CRH KO animals in comparison to their WT counterparts. Our results showed that lacking of CRH influence the development of stress reaction on the level of receptor proteins

KAŠRUT VE SVĚTLE MINULOSTI A PŘÍTOMNOSTI

Autorka: Sabina Richterová, 5. r.

Školitel: Doc. MUDr. Otakar Klein, CSc., Ústav hygieny a epidemiologie 1.LF a VFN

Kašrut je souborem ustanovení judaismu, jež určují, jaké potraviny, pokrmy se smí-nesmí jíst, jakým způsobem mají být připravovány a požívány. V doslovném překladu kořen tohoto hebrejského slova (stejně jako slovo košer) znamená vše, co je „vhodné, náležité, správné“. Ačkoliv jde o velmi propracovaný systém doporučení, příkazů a zákazů, v detailech velmi obsáhlých a složitých, hlavní zákony, z nichž se odvozují, jsou poměrně jednoduché. Zakládají se na biblických ustanoveních v Tóře, blíže specifikovaných v Talmudu (sbírce právních norem judaismu). Na téma významu těchto stravovacích příkazů se v průběhu staletí vedly nekonečné disputace a uváděla se nejrozmanitější zdůvodnění mystickými počínaje a medicínskými konče. Z hlediska dnešních hygienických a dietologických poznatků není pochyb, že některá doporučení kašrutu mají opravdu úzký vztah ke zdraví. Ve své práci předkládám srovnání některých dnešních názorů na výživu s tímto starozákonným odkazem. V tradičním pojetí má kašrut ale také neméně důležitý význam sociální, etický a duchovní.

DEGENERACE NEURONÁLNÍCH BUNĚK HIPPOCAMPU PO VÍCENÁSOBNÉM PODÁNÍ KYSELINY KAINÁTOVÉ

Autoři: Riljak Vladimír, 6. r. a Mgr. Milotová Martina

Školitel: Prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc., Fyziologický ústav 1.LF

Úvod: Pro studium neuroplasticity centrálního nervového systému se s úspěchem využívá účinků kyseliny kainátové. Tato neurotoxická substance slouží jako model řady chorob (např. temporální epilepsie, řady neurodegenerativních onemocnění apod.). V centrálním nervovém systému se váže na specifické kainátové receptory a tak vyvolává masivní depolarizaci neuronálních buněk, což ve svém důsledku může vést až k jejich zániku.

Metodika: V tomto experimentu jsme podávali kainát laboratorním potkanům typu Wistar /samci, váha 250-300g/ v šesti dávkách (5mg resp. 10mg), vždy ob jeden den. Po dvou dnech od poslední aplikace byla zvířata v hluboké pentobarbitalové narkóze transaortálně perfundována (neutrálním paraformaldehydem), jejich mozky vyjmuty a zpracovány na kryostatu. Následně byly řezy obarveny kombinací DNA barvení Hoechst a Fluoro-Jade B (to umožňuje identifikovat zanikající neurony). Preparáty byly hodnoceny ve světelném mikroskopu.

Výsledky: U zvířat vystavených šesti dávkám 10mg KA jsme pozorovali následující morfologické změny: CA1 oblast hippocampu: výrazné zeslabení tloušťky vrstvy pyramidových buněk, výrazné snížení denzity buněk, marginálně lze pozorovat gliózu.

CA2 oblast: velmi malé množství degenerovaných buněk a to převážně ve vrstvě buněk pyramidových. V porovnání s CA1 oblastí je tloušťka této vrstvy méně tangována. Glióza je zde méně výrazná, avšak denzita pyramidových buněk této oblasti je rovněž snížena.

CA3 oblast: Nenalezli jsme prakticky žádné degenerující buňky, zničené neurony jsou již částečně nahrazeny gliózou, která lemují lakuny po zaniklých pyramidových buňkách.

Hilus gyrus dentatus: nejsou patrné žádné degenerující neurony, pouze identifikujeme značnou gliózu.

Gyrus dentatus: oba listy (dorsální i ventrální) jsou prakticky bez morfologických změn.

Při podání dávky šestkrát 5mg KA je patomorfológický nález následující: nejvýrazněji degeneruje oblast CA1, především její začátek, přechod této oblasti v CA2 zůstal intaktní. Oblast CA3 a hilus gyrus dentatus: prakticky veškeré pyramidové buňky podlely destrukci a byly částečně nahrazeny glií.

Závěr: Porovnání pozorovaných změn u zvířat vystavených dávkou šestkrát 10mg a šestkrát 5mg dovoluje uzavřít, že nejvíce kainát-vulnerabilní strukturou je oblast CA3, která byla prakticky celá zničena již nižší z obou dávek. Stejně tak velmi snadno podléhají destrukci interneurony hilly gyrus dentatus. Výrazně tangována již při nižší dávce byla i oblast CA1, kde však dochází k degeneraci poněkud později. Nejrezistentnější vůči kainátu se tedy jeví oblasti obou listů gyrus dentatus, kde ani při vyšší z obou dávek nelze pozorovat žádné akutní morfologické změny. Je patrná pouze lehce snížená denzita buněk této oblasti.

Kardinální otázkou pochopitelně zůstává jaký je mechanismus pozorované buněčné smrti, resp. jakým mechanismem kainát zánik buněk vyvolává. Zda se na něm podílejí především jeho nespecifické, celkově toxické účinky, či zda zánik neuronálních buněk je dán jeho excitotoxickým účinkem, tedy masivní depolarizací neuronů vedoucí až k jejich zániku.



VLIV NEUROTROPHINŮ A JEJICH RECEPTORŮ NA VÝVOJ PACINIHO TĚLÍSEK

Autor: Jiří Šedý, 6. r.

Školitelé: Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc., Anatomický ústav 1. LF, Prof. Jan Kučera, MD, PhD, Department of Neurology, Boston University, USA

Paciniho tělíška jsou rychle se adaptující mechanoreceptory, uložené zejména v podkoží, na periostu a v interosseálních membránách. Jejich vývoj je podmíněn komplexními interakcemi axonů senzitivních neuronů a cílových buněk v periférii (Zelená, 1994). V této interakci se uplatňují neurotrophiny, které podmiňují diferenciaci a přežívání senzitivních neuronů. Zatímco pro proprioceptivní a nociceptivní zakončení byly zjištěny neurotrophiny, které jejich vývoj podmiňují, není dosud známo, které neurotrophiny jsou nutné pro vývoj Paciniho tělíšek. Objasnit tento vztah je cílem předkládané studie.

Byly použity transgenní myši s vyřazenými geny pro nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT3) a neurotrophin-4 (NT4) a jejich TrkA, TrkB, TrkC a p75^{NTR} receptory. Genotypizace transgenních zvířat byla prováděna pomocí PCR s použitím příslušných primerů. Skupina Paciniho tělíšek na bérce u novorozených zvířat byla kvantifikována *in situ* po imunohistochemickém znázornění průkazem cholinesterázy, nebo na sériových polotenných eponových řezech. Expres neurotrophinů a jejich receptorů v Paciniho tělíškách byla prováděna pomocí protilátek v kryostatových řezech.

Delece genu pro jednotlivé růstové faktory, právě tak jako pro jejich jednotlivé Trk receptory vedly ke snížení počtu Paciniho tělíšek a jejich inervujících axonů, ale nikdy k jejich úplné absenci. Deficity byly největší u *NT3*^{-/-} mutantní myši, méně u *BDNF*^{-/-} a nejméně u *NT4*^{-/-} myši. Delece *NGF* měla minimální dopad. Mutanty s vyřazenými geny pro neurotrophinové receptory ukázaly, že největší dopad má signalizace prostřednictvím receptorů TrkA a TrkB, méně TrkC a prakticky zanedbatelná je signalizace přes p75^{NTR} receptor. Použili jsme proto vícenásobné myši mutanty, které ukázaly, že vytvoření plného počtu Paciniho tělíšek a inervujících neuronů vyžaduje expresi *NT3*, zároveň s expresí *BDNF* nebo *NT4*.

Tyto výsledky ukazují, že pro vývoj Paciniho tělíška a jeho inervujícího neuronu je nejvýznamnější *NT3* v koexpresi s některým z dalších neurotrophinů. Tato signalizace vyžaduje především TrkA a TrkB receptor.

ASOCIACE EXPRESE GENU MRP5 S REZISTENCÍ K 9-[2-(FOSFONOMETHOXY)ETHYL]-2,6-DIAMINOPURINU V MODELU HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

Autor: Michal Zápotocký, 5. r.

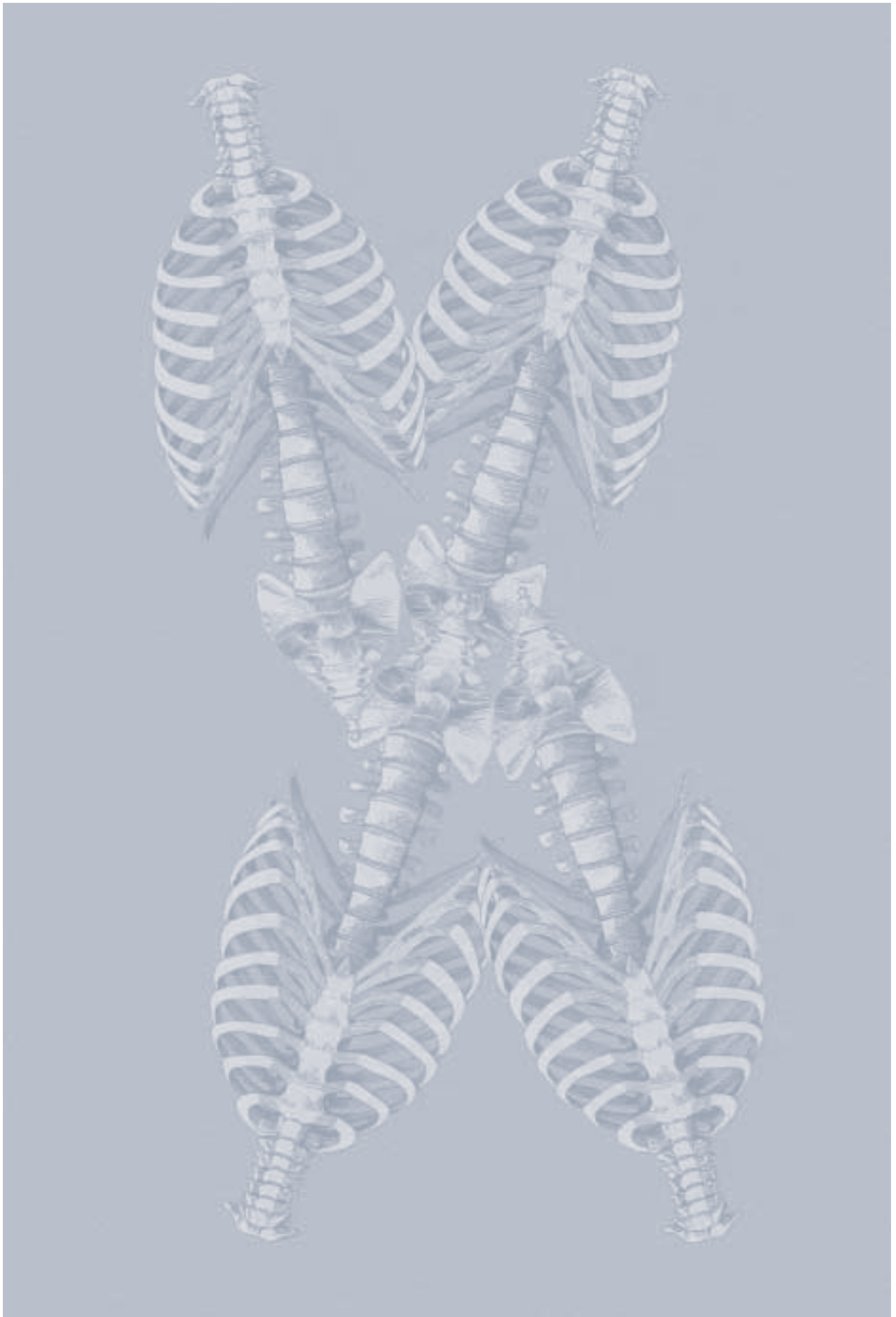
Školitel: Doc. RNDr. Berta Otová CSc., Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF a VFN, Mgr. Júlia Starková

V ÚOCHB AV ČR jsou vyvíjeny acyklické nukleosidfosfonáty, mezi kterými měla největší protinádorový účinek látka 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurin (PMEDAP). Ale i u nejúčinnějších látek je v průběhu protinádorové terapie pozorována rezistence k léčbě, nejčastěji mnohočetná léková rezistence. Gen MRP5 (rodina Multidrug Resistance Associated Protein-MRP) byl sledován v průběhu dlouhodobé aplikace PMEDAP *in vitro* a *in vivo* experimentech. V *in vitro* pokusu byly buňky CCRF-CEM kultivovány po dobu 5 týdnů v RPMI s PMEDAP o koncentraci 0 a 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Každých sedm dní byly odebírány vzorky k vyšetření exprese genu MRP5 metodou kvantitativní RT-PCR. V experimentu na této monoklonální kultuře se ukázalo, že exprese genu MRP5 stoupá v závislosti na čase a je to děj reverzibilní. T-lymfom SD10/96 rostoucí na inbrední linii potkanů Sprague-Dawley/Cub byl použit pro *in vivo* experiment. Čtyři po sobě jdoucí pasáže posloužily k modelování dlouhodobé terapie. 4 hodiny po poslední dávce byla v každé pasáži provedena autopsie, nádory byly zváženy a byly odebrány buňky na vyšetření exprese MRP5 metodou RQ-RT-PCR. Porovnávali jsme hmotnosti lymfomů a expresi MRP5. Přestože byly po 1. pasáži nádory léčených zvířat signifikantně menší než u kontrol, byla současně zvýšená exprese MRP5. Ve 2. pasáži byla již citlivost k PMEDAP snížena a exprese MRP5 byla signifikantně zvýšena. Ve 3. a 4. pasáži nebyly lymfomy citlivé k PMEDAP a exprese MRP5 byla srovnatelná s lymfomy neléčených zvířat. Z toho lze usoudit, že se vyseletoval klon maligních buněk, v kterých při rezistenci hraje roli jiný mechanismus.

Na modelech T-buněčných malignit byla prokázána účast genu MRP5 na vzniku rezistence vůči látce PMEDAP a v nejbližší době proběhne hodnocení vlivu dalších genů.



Práce studentů hodnotily komise složené z pedagogů 1. LF.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST

- Darsová Denisa, 5.r.
- Hriňová Petra, 5.r.
- Hůdková Daniela, 5.r.
- Ingrischová Michaela, 5.r.
- Krasulová Eva, 6.r.
- Křemen Jaromír, 6.r.
- Kučera Filip, 5.r.
- Rotreklová Jana, 5.r.
- Skalická Hana, 5.r.
- Sulek Štěpán, 3.r.
- Tuka Vladimír, 5.r.
- Vaňková Zdeňka, 6.r.
- Walker D. Nolan, 6.r.

Hodnotitelská komise

Předseda: Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc., MBA
Člen: Doc. MUDr. Miroslav Merta, CSc.



PRVNÍ POMOC PRO STŘEDNÍ ŠKOLY

Autoři: Denisa Darsová 5. r., Michaela Ingrisová 5. r., Barbora Jindrová, Lenka Bošanská, Mirek Zvolský
Školitel: as. MUDr. Václav Vávra, Klinika anesteziologie a resuscitace 1. LF a VFN (dále jen KAR)

Úvod: Správné poskytnutí laické první pomoci v prvních minutách postižení má rozhodující vliv na vitalitu tkání, hlavně CNS, a tedy kvalitu přežití poškozených. S cílem zlepšit znalosti záchranných postupů u středoškolských studentů probíhá na pražských SŠ již třetím semestrem projekt výuky technik první pomoci. Tento osvětový program uskutečňuje 7 studentů 1. LF UK (IV.-VI. roč.) pod záštitou organizace IFMSA (International Federation of Medical Students Associations) a KAR 1. LF UK a VFN, zastoupené as. MUDr. Václavem Vávrou.

Metodika: Výuka probíhá ve dvou vyučovacích hodinách formou diskuse mezi mediky a studenty. V úvodu je studentům zadán dotazník, který testuje jejich znalosti z poskytování první pomoci. Poté následuje vlastní výklad, který doplňuje svými zkušenostmi z praxe MUDr. Vávra. Druhá část výuky je věnována nácviku praktických dovedností- uvedení postiženého do stabilizované polohy a kardiopulmonální resuscitace na modelu s automatickým vyhodnocováním. Zhruba týden po skončení semináře zjišťujeme u studentů opakovaným zadáním dotazníků retenci předaných poznatků. **Závěr:** Do současnosti jsme proškolili cca 200 studentů. Výsledky dotazníkových šetření i naše subjektivní dojmy naznačují nedostatečnou úroveň znalostí o první pomoci. Obecně se naše přednášky setkaly s kladným přijetím u středoškolských i pedagogů. Projekt pokračuje dále v rámci IFMSA CZ, sekce Public Health.

PRAKTICKÝ LÉKAŘ A LÉČBA ZÁVISLOSTI NA TABÁKU: DOPORUČENÍ A SKUTEČNOST

Autorky: Petra Hriňová, 5. r., Daniela Hůdková, 5. r.
Školitelka: MUDr. Eva Králíková, CSc., Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

Úvod: V naší práci jsme se zaměřily na problematiku léčby závislosti na tabáku v ordinacích praktických lékařů. Většina osob navštíví během roku svého praktického lékaře – z kuřáků je to kolem 70%. Krátká intervence (3-5 min.) je jednou z možností léčby. I když její úspěšnost je relativně malá (5-8% dlouhodobě valorizované abstinence), stává se nejefektivnější metodou léčby závislosti na tabáku tím, že bude aplikována na každého kuřáka. Naším cílem byla snaha zjistit, do jaké míry se pacientům u nás této intervence dostává, také zda jim je nabízena náhradní nikotinová terapie či doporučena návštěva poradny pro odvykání kouření.

Metodika: V řízeném rozhovoru jsme se dotazovaly pacientů v čekárnách praktických lékařů v Praze, zda je jejich lékař seznámil se zdravotními riziky kouření a nabídl jim některou z možností léčby závislosti na tabáku, či doporučil návštěvu poradny pro odvykání kouření. Další část otázek byla zaměřena na informovanost pacientů o možnosti využití služeb těchto poraden. Jako vzor nám sloužil dotazník použitý v britském šetření zaměřeném na tutéž problematiku. Část dotazníků vyplnili s pacienty v rámci terénní práce z hygieny a epidemiologie studenti 5. ročníku.

Výsledky: Do termínu odevzdání abstraktu bylo dotázáno 400 pacientů, z nichž 110 tvořili kuřáci. Z dotazníků vyplynulo, že méně než 45% kuřáků bylo doporučeno jejich lékaři omezit či zanechat kouření. Žádnému pacientovi nebyla doporučena náhradní nikotinová terapie ani návštěva poradny. Téměř 90% kuřáků o službách poraden někde slyšelo, přičemž necelá polovina kuřáků nevěděla, co vlastně poradna nabízí. Poradnu navštívil 1 z dotázaných.

Závěr: Přibližně 40% lékařů uvádí, že svým pacientům doporučuje přestat kouřit, což se téměř shoduje s námi zjištěnými výsledky ze strany pacientů. Vzhledem k tomu, že kouření je významnou příčinou morbidit a mortality, měla by být krátká intervence a nabídka možností léčby závislosti na tabáku běžnou součástí primární péče. Během příštího měsíce bychom ještě rády zvýšily počet dotázaných. Aktuální výsledky budou prezentovány v tabulkovém a grafickém zpracování na konferenci.

INTRACELLULAR CYTOKINES IN PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS TREATED WITH PULSE CYCLOPHOSPHAMIDE.

Authors: Eva Krasulová, 6. r., Ivana Kovářová, Eva Havrdová, Helena Marečková
Advisor: Doc. MUDr. Eva Havrdová, CSc., Neurologická klinika VFN a 1.LF

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease of the central nervous system (CNS) of young adults. Immune mediated mechanisms play a crucial role in the pathogenesis. Though neurodegeneration with axonal loss is an early event in the course of MS, the therapeutic approach remains restricted to antiinflammatory drugs. Responsiveness of the patients to all available antiinflammatory drugs is limited.

Aim of the study: To detect if this responsiveness is generated by the shift in cytokine production profile of immune cells, we studied a group of MS patients with monthly pulse methylprednisolone (MP) and cyclophosphamide (CPA) therapy and looked for correlation between clinical responsiveness and proinflammatory cytokine production.

Patients and methods: 40 progressive MS patients (27 females, 13 males, age 46.9±9.2 yrs, duration of MS 14±6.9 yrs, EDSS 4.7±1.2) were divided into 2 groups according to clinical response (7 good responders + 19 stable patients versus 14 non-responders). Peripheral blood (PB) was taken 14 days after 1g MP and 1g CPA administration. PB from 10 age and sex matched healthy controls was used to compare cytokine production. PB cells were stimulated 4 hours by mitogen (LPS for monocytes, PMA+ ionomycin for T lymphocytes) in the presence of transport inhibitor protein -

Brefeldin A. Cells were fixed and permeabilized and staining by monoclonal antibodies BD Bioscience (anti CD3 PerCP, antiTNFalfa FITC, anti IL2 PE, anti IFNgamma FITC and anti IL4 PE, anti IL10 PE, anti IL12 PE and anti CD14 FITC. Samples were analyzed by flow cytometr FACSCalibur (BD) using three colour imaging.

Results and: Cytokine production did not differ significantly in treatment responders versus non-responders. Significant difference ($p > 0.000001$) was detected in production of IFN gamma, TNF alpha, IL2, IL10 and IL12 between MS patients and healthy controls.

Discussion: Significantly higher expression of CCR5+CXCR3 on CD4 lymphocytes of responders may be explained by the theory that immunosuppression is effective only where inflammation is still active. The difference in cytokine production between MS patients and healthy controls suggests that the immune hyperactivation is still present in the advanced disease even in the second decade of its duration and despite aggressive treatment.

ADIPOCYTÁRNÍ HORMONY U ZÁVISLÝCH NA HEROINU: VLIV METHADONOVÉ SUBSTITUČNÍ LÉČBY

Autoři: J. Křemen, 6. r., J. Housová, H. Wilczek, J. Křížová, M. Haluzík

Školitel: MUDr. Martin Haluzík CSc., III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Úvod: Intenzivní výzkumy posledních desetiletí zaměřené na význam a funkci tukové tkáně ukazují, že tato tkáň není pouze pasivní zásobárnou energie a termoregulačním prvkem, ale je i aktivním endokrinním orgánem. Historie tzv. adipocytárních hormonů (hormonů produkovaných převážně tukovou tkání) začíná v roce 1994 objevem leptinu, jehož sérové hladiny pozitivně korelují s obsahem tělesného tuku. Poznání leptinu iniciovalo mnoho studií, které kromě objevu dalších adipocytárních hormonů jako je resistin a adiponectin, přinesly i poznatky o úloze těchto hormonů při poruchách výživy různé etiologie. Nízké hladiny leptinu spouštějí řadu neuroendokrinních, metabolických i imunologických pochodů, vedoucích k adaptaci na hubnutí. Pravidelné užívání heroinu vede různými mechanismy k výraznému narušení nutričního stavu, mimo jiné způsobuje i mnoho změn v neuroendokrinním systému. Naproti tomu bylo prokázáno, že během methadonové substituční léčby došlo kromě zmírnění závislosti na droze i k normalizaci některých hormonálních poruch. Cílem naší studie bylo porovnat změny sérových hladin adipocytárních hormonů u uživatelů heroinu před a po roční terapii methadonem a posoudit možný význam těchto změn v regulaci nutričního stavu sledovaných pacientů.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 12 osob (věk $26,2 \pm 2,1$ roku; BMI $22,9 \pm 0,5$) užívajících dlouhodobě heroin ($9 \pm 0,5$ roku) a 20 zdravých kontrolních subjektů (věk $25,1 \pm 1,1$ roku; BMI $22,1 \pm 1,3$), všechny osoby prošly vstupním fyzikálním vyšetřením, uživatelé heroinu byli navíc znovu vyšetřeni po 1 rok trvající substituční terapii methadonem. Byly sledovány hladiny leptinu, solubilního leptinového receptoru (SLR), resistinu, adiponectinu, TNF- α , inzulinu, kortisolu, C-peptidu, provedeno bylo i standardní biochemické vyšetření.

Výsledky: Hladiny sérového leptinu, adiponectinu, SLR a kortisolu byly u uživatelů heroinu signifikantně nižší než u zdravých subjektů, naproti tomu hladiny resistinu byly zvýšené. Po 1 roce metadonové substituční léčby došlo u uživatelů drog ke vzestupu hladin leptinu a kortisolu, zatímco hladiny SLR a resistinu nebyly substituční léčbou ovlivněny. Tyto změny nebyly výrazněji závislé na nutričním stavu pacientů, po roce substituční léčby totiž u pacientů nedošlo k signifikantní změně body mass indexu.

Závěr: Sérové hladiny adipocytárních hormonů jsou u pacientů se závislostí na heroinu signifikantně změněny. Během roční substituční léčby methadonem došlo k normalizaci hladin leptinu, nikoliv však dalších adipocytárních hormonů. Předpokládáme, že normalizace hladin leptinu může být jedním z mechanismů, kterým metadonová substituce normalizuje některé neuroendokrinní odchylky spojené s chronickou závislostí na heroinu.

RIZIKOVÉ FAKTORY KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ A POLYMORFISMUS APOLIPOPROTEINU E V MONGOLSKU VE SROVNÁNÍ S ČESKOU POPULACÍ

Autoři: Filip Kučera, 5. r., Doc. MUDr. Richard Češka, CSc., MUDr. Michal Vrablík, Ph.D., Mgr. Helena Svobodová, MUDr. Altannavch, Ph.D., MUDr. Amartushan

Školitelé: Doc. MUDr. Richard Češka, CSc., MUDr. Michal Vrablík, Ph.D., III. interní klinika - klinika endokrinologie a metabolismu 1.LF a VFN

Úvod: Důsledkem kardiovaskulárních onemocnění umírá více než 50% populace v naší republice. V rozvojových zemích, jako je např. Mongolsko, dochází v poslední době ke stále zvyšující se kardiovaskulární mortalitě na úkor úmrtnosti na infekční choroby. I zde proto tato problematika nabývá na významu. Cílem naší práce bylo zmapovat formou pilotní studie rizikový profil Mongolska a dále provést analýzu polymorfismu apolipoproteinu E, který hraje roli nejenom v procesu aterogeneze, ale také v patogenezi onemocnění jako je např. Alzheimerova demence aj., ve srovnání s ČR.

Metodika: Studie zahrnovala městskou populaci žijící v Ulán Bátoru, jež čítala 621 jedinců (275 mužů ve věku od 15 do 83 let a 346 žen, ve věku od 18 do 84 let) a dále skupinu lidí z vesnice, žijící tradičním způsobem života mimo město, sestávající ze 123 jedinců (60 mužů ve věku od 14 do 73 let a 63 žen ve věku od 15 do 78 let).

U všech probandů byl stanoven BMI, obvod pasu, vyšetřen TK, dále každý vyplnil dotazník zaměřený na rodinnou a osobní anamnézu z hlediska kardiovaskulárních rizikových faktorů. U každého byl odebrán vzorek krve za účelem typizace apolipoproteinu E.

Výsledky: Prevalence obezity, hypertenze, diabetu mellitu, ICHS a abúzu cigaret a alkoholu v rodinné a osobní anamnéze, polymorfismu apolipoproteinu E, v závislosti na skupině a pohlaví, je srovnána s českou populací.



Závěr: Kardiovaskulární rizikový profil mongolské populace vykazuje některé podstatné rozdíly vzhledem k české populaci, nicméně pilotní studie sestávala pouze z omezeného počtu jedinců.

ROZDÍLNÁ BAROREFLEXNÍ REGULACE PŘI HRUDNÍM A BRÁNIČNÍM DÝCHÁNÍ

Autoři: Jana Rotreklová, 5. r., Vladimír Tuka, 5. r., Jan Molinský, Jan Malík, Jan Šimek, Dan Wichterle
Školitel: MUDr. Jan Malík, CSc., III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF a VFN

Úvod: Abnormality baroreflexní regulace jsou spojeny se zvýšeným rizikem úmrtí u pacientů po infarktu myokardu a u pacientů se srdečním selháním. Reflexní změny vyvolané ventilačními pohyby mohou nezávisle na doprovodných změnách krevního tlaku interferovat s baroreflexním okruhem.

Metody: Studovali jsme 12 zdravých dobrovolníků (6 žen, věk 23 ± 1 let). Každý subjekt podstoupil v náhodném pořadí dvě 3-minutové epizody hrudního a bráničního dýchání. Ventilační frekvence 0.1 Hz (6 dechů/min) byla řízena optickým signálem a konstantní dechový objem byl udržován zpětnovazebně pomocí spirometru. Byly zaznamenány EKG a neinvazivní krevní tlak na prstu (Finapres). Variabilita srdeční frekvence (SF), systolického krevního tlaku (TKs) a baroreflexní senzitivita (BRS) byly stanoveny spektrální a cross-spektrální metodou v nízkofrekvenčním pásmu.

Výsledky: Při hrudním dýchání byla i přes totožnou ventilační frekvenci a dechový objem nalezena signifikantně zvýšená variabilita SF, zvýšená BRS a trend ke snížené variabilitě TKs v porovnání s bráničním dýcháním (Tabulka). Rozdíl v BRS byl nezávislý na srdeční frekvenci.

Závěr: Hrudní dýchání je oproti bráničnímu dýchání spojeno s efektivnější baroreflexní regulací. Fyziologickým podkladem je patrně rozdílná aktivace tlakových receptorů v hrudní aortě a mechanoreceptorů v plicích a v levé srdeční komoře. Tento náález, pokud by byl ověřen u pacientů s organickým srdečním onemocněním, má potenciální klinický význam, protože trénink hrudního dýchání by mohl zlepšit jejich prognózu.

DÝCHÁNÍ			
	hrudní	brániční	p
Variabilita SF (ms ²)	7273 ± 4972	5792 ± 4863	0.019
Variabilita TKs (mmHg ²)	11.9 ± 4.9	16.2 ± 15.2	0.39
BRS (ms/mmHg)	24.7 ± 10.1	19.3 ± 8.1	0.0004

RESPIRAČNÍ VARIABILITA INTEGRÁLU RYCHLOSTI PROUDĚNÍ KRVE – PREDIKTOR REAKTIVITY NA VOLUMEXPANZI U ZDRAVÝCH DOBROVOLNÍKŮ

Autoři: Hana Skalická, 5. r., Roman Škulec, Aleš Linhart, Ondřej Čermák, J. Bělohávek, T. Kovárník, M. Aschermann
Školitel: MUDr. Roman Škulec, II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie 1. LF a VFN

Zhodnocení zda pacient s hypotenzí bude anebo nebude odpovídat na volumexpanzi zvýšením srdečního výdeje je jeden z nejobtížnějších úkolů v péči o kriticky nemocné. Doposud není známý dostatečně spolehlivý prediktor reaktivity na volumexpanzi. Je však možné, že jím může být stanovení respirační variability některých průtokových parametrů pomocí transtorakální echokardiografie (TTE).

Cíl: Zjistit, zda respirační variabilita integrálu rychlosti průtoku krve aortální chlopní (ACH) je prediktorem pozitivní reaktivity na volumexpanzi u zdravých spontánně ventilujících jedinců.

Metoda: U 12 dobrovolníků jsme pomocí TTE za standardních podmínek stanovili respirační variabilitu respirační variabilitu integrálu rychlosti proudění krve ACH (Δ VTI ACH) na počátku studie a po indukci hypovolemie nitrožilní dávkou furosemidu 0,5 mg/kg. Poté byli dobrovolníci randomizováni k podání volumexpanze (skupina A) anebo k dalšímu žíznění bez volumexpanze (skupina B). Posléze byly opět stanoveny sledované parametry. Při každém měření jsme echokardiograficky stanovili srdeční index (C.I., l/min/m²).

Výsledky: Indukce hypovolemie vedla za 90 ± 25 minut k průměrné diuréze 1692 ± 262 ml a k signifikantnímu poklesu C.I. o 25% ($p < 0,001$). Zároveň jsme, ve srovnání s vstupní hodnotou, pozorovali výrazný nárůst Δ VTI ACH ($5,64 \pm 3,01$ a $22,81 \pm 7,60$, $p < 0,0001$). Po randomizaci a podání volumexpanze došlo ve skupině A ve srovnání s předchozím měřením k významnému nárůstu průměrného C.I. o 49% a k poklesu průměrné Δ VTI ACH na $3,49 \pm 1,88$ ($p < 0,001$). Statisticky významný nárůst C.I. a pokles Δ VTI ACH byl pozorován u všech jednotlivců ve skupině A. Naopak, ve skupině B nedošlo k žádné významné změně C.I. a Δ VTI ACH.

Závěr: Nárůst Δ VTI ACH stanovené pomocí TTE je citlivým prediktorem pozitivní reaktivity na volumexpanzi u zdravých spontánně ventilujících jedinců. Zda bude tento parametr prediktorem reaktivity na volumexpanzi i u kriticky nemocných s nízkým minutovým srdečním výdejem musí potvrdit další randomizované klinické studie.

PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A (PAPP-A) U CHRONICKY HEMODIALYZOVANÝCH PACIENTŮ

Autor: Štěpán Sulek, 3. r.

Školitel: MUDr. Lenka Fialová, CSc., Ústav lékařské biochemie 1. LF

PAPP-A je metaloproteináza, jejíž sérové hladiny se zvyšují u chronicky dialyzovaných pacientů. Nedávné studie naznačují, že PAPP-A by mohl být cenným ukazatelem akutního koronárního syndromu. V naší studii jsme sledovali sérové hladiny PAPP-A u dvou skupin chronicky hemodialyzovaných (HD) pacientů. Dále jsme sledovali souvislost mezi hladinami PAPP-A a rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění (LDL, HDL a celkový cholesterol, CRP, TK, BMI). Soubor tvořilo 23 HD pacientů s CHRI na podkladě glomerulonefritidy (GN) (15 pacientů) nebo chronické intersticiální infekční nefritidy (CIIN)(8 pacientů). V kontrolní skupině (KS) bylo zařazeno 13 nedialyzovaných pacientů s různým stupněm CHRI. Koncentrace PAPP-A v séru byly stanoveny TRACE metodou (Time Resolved Amplified Cryptate Emission). Hladiny PAPP-A byly u HD pacientů s GN ($25,54 \pm 12,79$ mIU/l) i CIIN ($20,81 \pm 9,02$ mIU/l) signifikantně zvýšené ve srovnání s KS ($9,61 \pm 4,01$ mIU/l), (GN vs. KS $p < 0,0005$; CIIN vs. KS $p < 0,001$), ale mezi oběma skupinami HD pacientů nebyl rozdíl. Byla prokázána významná pozitivní korelace mezi koncentracemi LDL cholesterolu a PAPP-A ($r = 0,49$; $p < 0,05$) a hraničně pozitivní korelace mezi PAPP-A a celkovým cholesterolem ($r = 0,40$; $p = 0,061$) u HD pacientů. V kontrolní skupině byla zjištěna pozitivní korelace mezi PAPP-A a systolickým TK ($r = 0,64$; $p < 0,05$). Studie potvrdila, že hladiny PAPP-A se významně zvyšují u HD pacientů. Naše výsledky naznačují možnou souvislost hladin PAPP-A a kardiovaskulárním rizikem.

SMYKOVÁ RYCHLOST V PŘÍVODNÉ TEPNĚ DIALYZAČNÍHO CÉVNÍHO PŘÍSTUPU U DIABETIKŮ

Autoři: Vladimír Tuka, 5. r., Jan Malík, Jana Rotreklová, 5. r.

Školitel: MUDr. Jan Malík, CSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF

Úvod: V populaci České Republiky je 6-7% diabetiků, k rozvoji diabetické nefropatie dochází u cca 20% z nich. Diabetici jsou indikováni k hemodialýze časněji než nediabetici a mají v chronickém hemodialyzačním programu více komplikací. Jde mj. o kratší životnost cévního přístupu a častější výskyt ischemie končetiny s cévním zkratem. Po jeho vytvoření prudce stoupá průtok přívodnou tepnou, a to i přes výskyt diabetické angiopatie. Vysoké hodnoty smykové rychlosti jsou známým etiopatogenetickým faktorem např. v rozvoji chlopenních stenóz. Položili jsme si otázku, zda mají diabetici vyšší hodnoty smykové rychlosti v přívodné tepně než nediabetici.

Metody: Celkem bylo ultrasonograficky vyšetřeno 31 pacientů s cévním zkratem vycházejícím z a. radialis a 32 pacientů se zkratem vycházejícím z a. brachialis. Byl měřen průměr přívodné tepny, systolická, end-diastolická a střední rychlost. Předpokládali jsme parabolické poiseuilleovo rozložení rychlostí toku v cévě a vypočítali jsme smykovou rychlost WSR (wall shear rate) podle vzorce: $WSR (s^{-1}) = 4 \cdot v / d$, kde v je rychlost toku krve a d je vnitřní průměr tepny.

Výsledky:

Diabetes	A. radialis		A. brachialis	
	Ano	Ne	Ano	Ne
WSR max (s^{-1})	$5047 \pm 4145^{**}$	$2256 \pm 1114^{**}$	$2012 \pm 579^{*}$	$1540 \pm 638^{*}$
WSR min (s^{-1})	$2740 \pm 1857^{*}$	$1461 \pm 703^{*}$	1080 ± 382	894 ± 293
WSR mean (s^{-1})	$3734 \pm 2906^{**}$	$1802 \pm 868^{**}$	1445 ± 495	1149 ± 424

*) pro $p < 0,05$; **) pro $p < 0,01$

Závěry: Diabetici mají statisticky významně vyšší hodnoty smykové rychlosti v přívodné tepně (zejména v případě distálních zkratů). Tyto hodnoty jsou srovnatelné s hodnotami WSR u nemocného s těsnou aortální stenózou. Lze předpokládat, že vysoký WSR je jedním z patofyziologických mechanismů častého rozvoje komplikací cévního zkratu u diabetiků.

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI FOSFOLIPIDŮM

Autorka: Zdenka Vaňková, 6. r.

Školitelé: MUDr. K. Malíčková, Prof. MUDr. T. Fučíková, DrSc., RNDr. I. Janatková, Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN (dále jen ÚIM)

Úvod: Antifosfolipidový syndrom (APS) je systémové autoimunitní onemocnění charakterizované klinicky tepennými a/nebo venózními trombózami, recidivujícími spontánními potraty nebo trombocytopenií a laboratorně pozitivitou antifosfolipidových protilátek (APLA) a/nebo přítomností lupusového antikoagulans. V imunologické laboratoři ÚIM je od roku 2000 vyšetřováno široké spektrum APLA ve třídě IgG a IgM. V této práci jsme se zaměřili na rozdíly v titrech a spektru APLA u pacientů s primárním či sekundárním APS a pozitivními laboratorními nálezy u lidí, jejichž klinický obraz nesvědčí pro APS.



Metodika: Stanovení APLA se provádí metodou ELISA, a to nejprve screeningově proti směsi fosfolipidů, pozitivní vzorky jsou dále testovány proti jednotlivým fosfolipidům (β -2-glykoproteinu, kardiolipinu, fosfatidylserinu, fosfatidylinositolu a kyselině fosfatidové). Celkem bylo v ÚIM v roce 2002 a 2003 provedeno 4195 screeningových vyšetření a 164 typizací. Typizováno bylo celkem 49 pacientů (1,2%) s prokázanou pozitivitou autoprotilátek proti aspoň jednomu fosfolipidu. Tito nemocní byli rozděleni do 4 skupin: sk. 1 – primární APS (n=13), sk. 2 – sekundární APS (n=13), sk. 3 – pacienti s autoimunitním onemocněním bez příznaků APS (n=10) a sk. 4 – pacienti bez průkazu autoimunitní choroby (n=13).

Výsledky: Ve sk.1 jsme našli statisticky významně vyšší titry všech APLA ve třídě IgM než ve sk.4. Stejný byl i výsledek srovnání skupin 2 a 4 (s výjimkou protilátek proti kardiolipinu). Hladina APLA ve třídě IgM však korelovala s celkovou hladinou IgM jednotlivých pacientů. Ve třídě IgG a mezi ostatními skupinami jsme žádný statisticky významný rozdíl nezaznamenali. Nebyl nalezen vztah mezi pozitivitou konkrétní protilátky a klinickým obrazem.

Závěr: 1. Pro stanovení diagnózy APS je třeba vyšetřit celé spektrum APLA ve třídě IgG i IgM a zejména v izotypu IgM je důležitá také výše titru APLA.

2. Spíše než pozitivita jedné APLA má klinický význam jakákoli kombinace APLA.

AN EVENT-RELATED FMRI STUDY OF BRAIN ACTIVATION DURING VOLUNTARY AND PASSIVE HAND MOVEMENTS IN HEALTHY CONTROLS.

Author: Nolan D. Walker, Robert Jech, Petr Dušek, Petra Havránková and Thomas Sieger

Advisor: MUDr. Robert Jech, Ph.D., Department of Neurology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

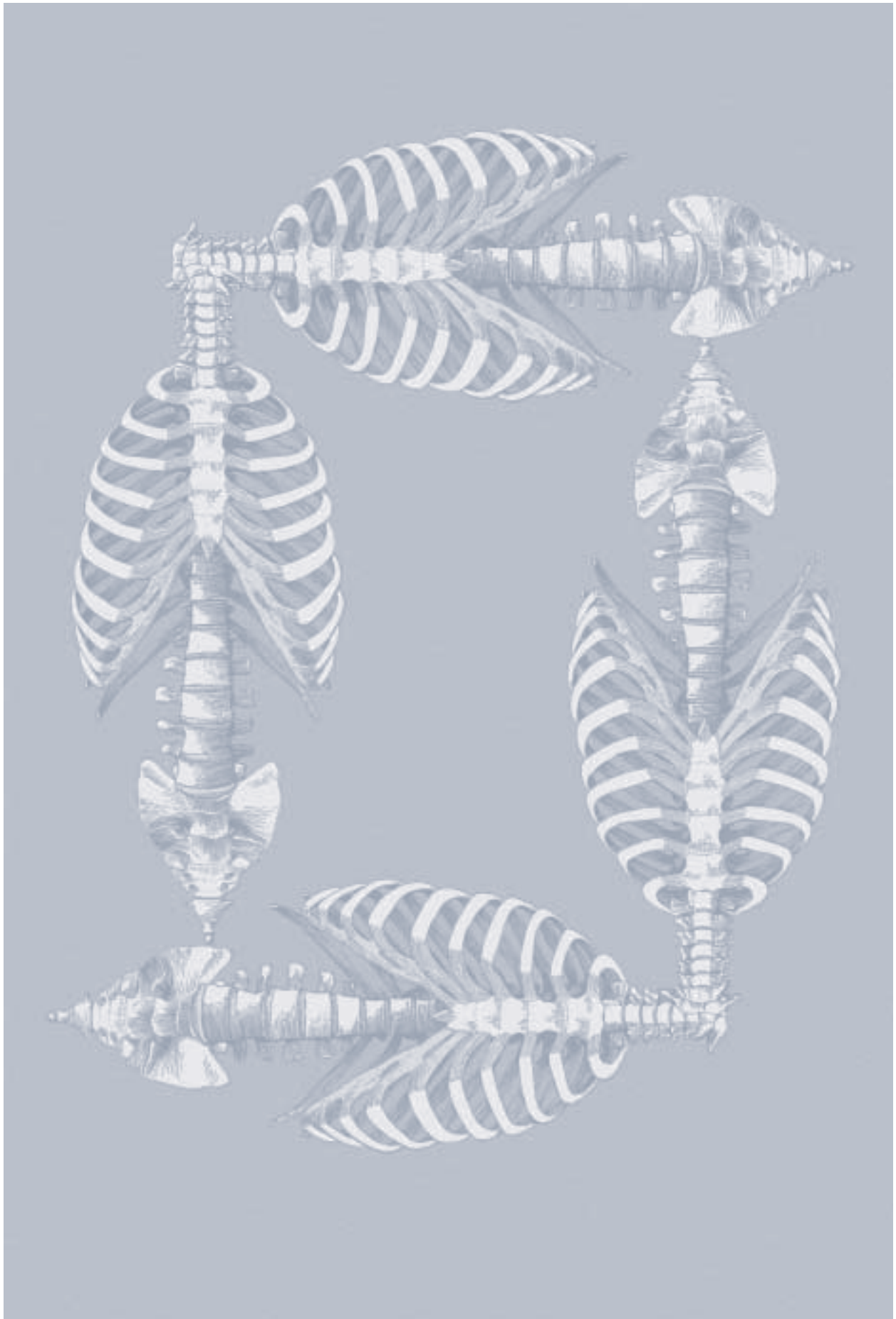
Aim: The performance of voluntary and passive hand movements respectively uses different cortico-subcortical mechanisms of motor planning, execution and somatosensory perception. We wanted to localise these areas and compare their cortical activation patterns. If these results showed significant and relevant areas of activation we would use this model to test writer's cramp patients.

Methods: Ten right-handed healthy subjects participated in the study. The subjects made a single flexion and extension of the fingers of their right hand. Subjects were asked to move their hand randomly approximately 10 times during the 6-minute task. The passive task was exactly the same as the voluntary except that the examiner moved their fingers passively. The fMRI was examined on the 1.5 T scanner Siemens Symphony using EPI sequence. The beginning and duration of each movement was recorded by a video camera. An event-related design was used for analysis (SPM99).

Results: Voluntary movement elicited a significant increase of the BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) signal in the primary sensori-motor cortex (SM1), supplementary motor cortex (SMA) and in the cerebellum (group analysis, $P < 0.05$, corrected). Activation was highest in the contralateral SM1, putamen and in the ipsilateral cerebellum.

Passive movements showed activation in the same regions as voluntary movements. However the areas with increased BOLD signal were much greater and particularly extended in the primary and secondary somatosensory areas. SMA and left putamen activation was located more posteriorly than during voluntary motion. Passive versus voluntary motion revealed higher activation in the left SM1 and in posterior part of the right superior temporal gyrus (BA42) ($P < 0.05$, corrected). In comparison the voluntary versus passive motion was associated with a lesser but significant increase in the left premotor and dorsolateral prefrontal cortex ($P < 0.001$, uncorrected).

Conclusion: The active areas show the expected activation of both premotor: planning of movement and somatomotor: execution of movement. Surprisingly, passive movements were accompanied by larger activations than the voluntary ones. We attributed this to the entirely novel nature of the task's movement, learning as well as the emotional response to human touch. In particular the activation of the right BA42 can be attributed to the recognition mechanisms and perhaps the processing of the newly experienced proprioception and tactile stimulation. The greater activation in premotor cortex in voluntary tasks and the slightly different parts of the putamen and the SMA involved in passive tasks suggests that there are differences in the cortical regions involved in the planning and execution of movements. This model is thus suitable for testing writer's cramp patients are known to show variations to controls in these areas but as yet have not been tested in voluntary and passive movements.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY

- Böhm Marek, MUDr.
- Fikáčková Hana, MUDr.
- Hořejší Magdaléna, MUDr.
- Hyánek Tomáš, MUDr.
- Chachkhiani Ivane, MUDr.
- Chovanec Martin, MUDr.
- Janatová Markéta, Mgr.
- Keslová Jana, Mgr.
- Kučera Tomáš, MUDr.
- Lígasová Anna, Mgr.
- Linková Lucie, MUDr.
- Mikula Ivan, Ing.
- Pavlišta David, MUDr.
- Pešina Jiří, MUDr.
- Podzimek Štěpán, Mgr.
- Trča Stanislav, MUDr.
- Sikora Jakub, MUDr., Dobrovolný Robert, Mgr., Hujová Jana, Ing.
- Stibůrek Lukáš, Mgr.
- Velenovská Marie, MUDr.
- Veselá Kateřina, Ing.
- Záhoráková Daniela, Mgr.
- Zikán Michal, MUDr.

Hodnotitelská komise

- Předseda:** Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
Členové: Prof. RNDr. František Vítek, DrSc.
Doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.



CLINICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CHILDREN WITH COX DEFICIENCY

Authors: Marek Böhm¹, Ewa Pronicka², Elżbieta Karczmarewicz³, Maciej Pronicki⁴, Dorota Piekutowska-Abramczuk⁵, Ewa Popowska⁵, Jolanta Sykut-Cegielska², Hanna Mierzewska², Hana Hansíková¹, Kateřina Veselá¹, Hana Houšť'ková¹, Josef Houšť'ek¹ and Jiří Zeman¹

Advisor: Prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Center of Integrated Genomics, Department of Pediatrics¹, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic and Division of Metabolic Diseases, Department of Paediatrics², Department of Biochemistry and Experimental Medicine³, Department of Pathology⁴ and Department of Medical Genetics⁵, The Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

Clinical, biochemical and molecular characteristics of cytochrome c oxidase (COX) deficiency was studied in 177 children from 140 unrelated families from Poland and Czech and Slovak Republics. Methods: The activities of respiratory chain (RC) complexes were measured spectrophotometrically in isolated muscle mitochondria and/or cultivated fibroblasts in children with suspicion of mitochondrial disease. PCR-RFLP, Southern blot and cyclic sequencing were used for mutation analyses in mtDNA and SURF1 and SCO2 genes. Results: Isolated COX deficiency was found in 99 children whereas in 78 children the decrease in COX activity was observed in combination with other RC disturbances. mtDNA deletions were detected in 7 children, mtDNA depletion in 1 child, mutation A3243G in 6 and mutations A8344G, A8348G, G8364A and del9205TA each in one case. Mutations in SURF1 gene were found in 46 children with Leigh syndrome (72% with the mutation 841delCT), mutations in SCO2 gene were present in 8 children with early development of encephalomyopathy and/or cardiomyopathy (G1541A was detected in 80%). The first clinical onset of disease was in 39% of children early after birth and in 40% of children in the age from 3 till 18 month. Failure to thrive was observed in 64% of patients, encephalopathy in 90%, hypotony in 72% and cardiomyopathy in 23%. In most children, increased levels of lactate and alanine were found in blood and CSF. The course of the disease was usually progressive, 67% of affected children died in early childhood. Conclusion: COX deficiency in childhood represents a very heterogeneous group of diseases with unfavourable prognosis. Detailed characterisation of COX on the protein and molecular level is **necessary for** genetic counselling in affected families. Mutations 841delCT in SURF1 gene and G1541A in SCO2 gene are prevalent, at least in Slavonic population.

Acknowledgments: This work was partly supported by IGA NR/8065-3 and MSM 111100003.

VYUŽITÍ INFRAČERVENÉ TERMOGRAFIE V DIAGNOSTICE PORUCH ČELISTNÍHO KLOUBU: PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY

Autoři: Hana Fikáčková, Jan Tax, Monika Meszarošová, Radek Jirman

Školitel: Doc. MUDr. Leoš Navrátil CSC., Ústav biofyziky a informatiky 1. LF

Úvod: Temporomandibulární poruchy (TMP) jsou považovány za nejčastější příčinu bolesti v orofaciální oblasti nedentálního původu. Infračervená termografie je neinvazivní, neionizující pomocná diagnostická metoda zobrazující množství tepla emitovaného kůží. Klinické studie prokázaly teplotní symetrii podle střední osy u zdravých jedinců. Asymetrický teplotní obraz může být považován za indikátor patologických stavů spojených se změnou povrchové teploty (neurovasikulární poruchy, zánětlivé procesy, ischemické změny, maligní onemocnění povrchově uložených struktur).

Cíle studie: 1) Vypracovat metodiku termografického vyšetření a vyhodnocení termogramů obličeje. 2) Zhodnotit přínos infračervené termografie v diagnostice TMP.

Metodika: Termograficky vyšetřené osoby byly rozděleny podle diagnózy do 3 skupin: Skupina A: dobrovolníci bez vedlejšího patologického nálezu (36 osob); skupina B: dobrovolníci s vedlejším patologickým nálezem (21 osob); skupina C: pacienti s TMP (90 osob). Termografická měření byla prováděna kamerami s infračerveným detektorem, který má teplotní rozlišitelnost 0,08 °C při teplotě 30 °C. Teplotní obrazy byly vyhodnoceny programem ThermoAnalyzer. Ke statistickému zpracování byly použity teplotní odchylky mezi pravou a levou stranou obličeje v námi zvolených oblastech.

Výsledky: V jedné z pěti analyzovaných oblastí jsme prokázali, že infračervená termografie je schopna na hladině významnosti 0,05 oddělit skupinu zdravých dobrovolníků od skupiny pacientů s bolestivou TMP. V této oblasti je možné u pacientů s jednostrannou bolestí považovat teplotní rozdíly větší než 0,3 °C za diagnosticky významný. Neprokázali jsme schopnost infračervené termografie od sebe odlišit jednotlivé diagnostické podskupiny TMP. Jelikož byla dosud provedena analýza teplotní změny pouze v 5 oblastech, považujeme výsledky této studie za předběžné.

Závěr: Sestavili jsme metodiku termografického měření a vytvořili nástroj (program ThermoAnalyzer) umožňující zajistit standardní postupy při vyhodnocování teplotních obrazů obličeje. V souladu s výsledky zahraničních studií tato studie prokázala schopnost infračervené termografie odlišit pacienty s TMP od zdravých dobrovolníků.

ZVÝŠENÝ OXIDAČNÍ STRES U HEMODIALYZOVANÝCH PACIENTŮ

Autorka: Magdaléna Hořejší (Marta Kalousová, Sylvie Sulková, Tomáš Zima)

Školitelka: MUDr. Marta Kalousová, Ph.D., Ústav lékařské biochemie 1. LF

Úvod: Hemodialyzovaní (HD) pacienti jsou vystaveni oxidačnímu stresu, který může přispívat k urychlené ateroskleróze. Oxidační stres může být potencován intravenózní (i.v.) aplikací železa. AOPP (produkty pokročilé oxidace proteinů) jsou markerem oxidačního stresu a PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A) je nový marker akutních koronárních syndromů, asociovaný se zánětem a oxidačním stresem. Cílem práce bylo zjistit vliv i.v. aplikace železa na koncentrace PAPP-A a AOPP u HD pacientů.

Metodika: PAPP-A byly stanoveny imunochemicky (TRACE) a AOPP spektrofotometricky u 20 (PAPP-A), resp. 10 (AOPP) HD pacientů v průběhu dialýzy bez a s i.v. aplikací 62,5 mg glukonanu sodno-železitého v 65. minutě HD.

Výsledky: Pozorovali jsme zvýšení koncentrace PAPP-A v 60. minutě HD, které přetrvávalo do 130. minuty HD a následný pokles PAPP-A k predialyzačním hodnotám na konci HD ($p < 0,005$). Po i.v. podání železa došlo k vzestupu PAPP-A (z $36,0 \pm 9,9$ na $79,6 \pm 28,9$ mU/l, $p < 0,0001$) i AOPP (z $93,0 \pm 33,5$ na $143,7 \pm 48,8$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,01$). Na konci HD koncentrace PAPP-A klesla ($p < 0,0001$) a koncentrace AOPP se již dále neměnila.

Závěr: I.v. podání železa ve formě glukonanu sodno-železitého zvyšuje zátěž oxidačním stresem a tím může přispívat ke komplexu faktorů podílejících se na cévním postižení u HD pacientů.

Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/8094

HYPERHOMOCYSTEINEMIE U PACIENTŮ V INTENZIVNÍ PÉČI JAKO PREDIKÁTOR MORBIDITY A MORTALITY

Autor: Tomáš Hyánek

Školitelka: Doc. MUDr. Dana Marešová, CSc., Fyziologický ústav 1. LF

Úvod: Zvýšená hladina homocysteinu (Hcy) v krvi je ve formulaci Motulskeho - ekogenetický rizikový faktor s multifaktoriálním účinkem, dosud nedokonale prozkoumaným. Výsledky experimentálních i epidemiologických studií ve velké převaze dokazují příčinnou souvislost mezi zvýšenou hladinou Hcy a zvýšeným výskytem kardiovaskulárních, tromboembolických a obliteračních onemocnění. Z odborných diskusí posledních let vyplývá, že nejenom známý molekulárně genetický původ HHC z deficitu MTHFR(677C>T) je ještě umocňován důvodem nutričním - deficitem kritických vitamínů (koenzymů)-nezbytných pro úspěšnou remethylaci a transulfuraci Hcy (folát, B₆, a B₁₂). Toxických účínů zvýšené hladiny homocysteinu bylo popsána celá řada: přímo na endoteliální buňky, degradaci elastinu, syntézu kolagenu, na koagulační proteiny ve smyslu zvýšení prokoagulační aktivity, snížení fibrinolýzy, zvýšený oxidační stress a další. Zatímco v běžné populaci pacientů suplementace vitamínů přináší efekt v snížení hladiny Hcy i rizika kardiovaskulárních chorob, populace pacientů intenzivní péče (IP) nebyla zatím studována. Nepříznivé ovlivnění fluidokoagulační rovnováhy musí být pro lékaře intenzivisty alarmující. Krátká doba hospitalizace na pracovišti IP, časté multiorgánové postižení pacientů, stavy těžkého katabolismu a výrazně vyšší incidence HHC v populaci pacientů IP nás vedlo k potřebě hledat vztah mezi mHHC, závažností multiorgánového postižení pacientů, délkou hospitalizace a mortalitou.

Metodika: 79 náhodně vybraných pacientů IP z let 2001-2003, hladina celkového homocysteinu (tHcy) stanovena rutinní enzymatickou metodou na automatickém analyzátoru Synchron LX 20 2. den hospitalizace; dále určena závažnost stavu pacienta pomocí score APACHE II. (všeob.uznávaný skorovací systém ke standardizaci stavu pacienta v intenzivní péči); sledována délka hospitalizace, mortalita; následně pak stanovena závislost Hcy a vybraných parametrů APACHE II. skóre.

Výsledky: frekvence HHC v populaci pacientů IP je velmi vysoká. Z celkového počtu vyšetřených JIP NNH činila 1:3,15, z pacientů hospitalizovaných na ARO pak 1:2,71. Vstupní vyšetření tHcy významně statisticky koreluje s tíží onemocnění prezentovanou hodnotou score APACHE II., stejně významně jako s ledvinovou funkcí dokumentovanou hladinou kreatininu a urey ($p = 0,0039$). Jako prognostický marker mortality však tHcy nelze použít protože s hladinou tHcy významně nekoreluje ($p = 0,124$)

Závěr: Hyperhomocysteinemie se vyskytuje v nemocniční populaci pacientů daleko častěji než se dosud předpokládalo, protože nebyla systematicky vyšetřována a na JIP se s jejím negativním účinkem nepočítá a protože nemocnost těchto pacientů je mnohem nepříznivější.

ODLIŠNÁ DYNAMIKA LEPTINU A KORTIZONU V PRŮBĚHU POOPERAČNÍ STRESOVÉ ODPOVĚDI

Autoři: I. Chachkhiani, R. Gürlich, P. Maruna, J. Kofránek

Školitel: Doc. MUDr. Robert Gürlich, CSc., I. chirurgická klinika-břišní, hrudní a úrazová chirurgie 1. LF a VFN

Úvod: Leptin je hormon a reaktant akutní fáze s pleiotropními efekty v klidovém i zánětlivém období. Efekty leptinu v reakci akutní fáze pravděpodobně zahrnují i modulaci stresové HPA osy. Následující studie hodnotila dynamiku akutních změn leptinu a glukokortikoidů v průběhu pooperační stresové odpovědi.



Pacienti a metodika. Předmětem studie byli 1.) pacienti po operaci kolorektálního karcinomu (16 osob), 2.) pacienti po bandáži žaludku (13) a 3.) pacienti s rozvojem pooperační sepse (22). 4) kontrolní skupina (18). Koncentrace leptinu, ACTH, kortizolu, TNF α , IL-6, CRP a alfa $_1$ -antitrypsinu (AAT) byly měřeny mezi -7. až +3. dnem vzhledem k operačnímu výkonu, resp. 2. den po objevení se příznaků sepse.

Výsledky. Všechny sledované parametry reagovaly na operační trauma zvýšením +12 h, resp. v případě leptinu +24 h od začátku operace. Vzestup leptinu je výraznější u 1. skupiny a odráží rozsah operačního zákroku. Koncentrace kortizolu 1. skupiny dosahovaly septických hodnot, stejně tak i maximální koncentrace leptinu u 2. skupiny. Ostatní parametry 1. a 2. skupiny se od septických hodnot odlišovaly na $p < 0,01$. Nebyla prokázána stat. významná korelace mezi leptinem a kortizolem, resp. leptinem a ACTH.

Závěr. Vzestup koncentrace leptinu v pooperačním období odráží odlišnou regulaci syntézy leptinu v klidovém období a v průběhu zánětové odpovědi. Inhibiční efekt leptinu na stresovou HPA osu byl dokumentován *in vitro*, ale jeho význam *in vivo* je zpochybňován. V naší studii nebyla prokázána statisticky významná závislost kortizolu ve vztahu k leptinu ani k dalším zánětlivým parametrům. Rozdílná dynamika leptinu a kortizolu po chirurgickém zákroku ukazuje, že oba faktory podléhají odlišné regulaci.

MODULATION OF GLYCAN STRUCTURE IN SQUAMOUS EPITHELIA AND MALIGNANCY: A KEY TO REGULATE PROTEIN-CARBOHYDRATE RECOGNITION *IN SITU*

Authors: Chovanec M, Plzák J, Betka J, Smetana K Jr, Plzáková Z, Gabius H-J

Advisors: Prof. MUDr. Karel Smetana Jr., DrSc., Institute of Anatomy, Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc., Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Squamous epithelia represent a morphologically and functionally stratified tissue with a pool of proliferating cells located basally. The aim of this study was detection and analysis of differentiation-dependent regulation of glycan epitopes relevant for information transfer in cells of the epithelium. Using simultaneous double labeling at the single-cell level we visualized ligand structures by labeled plant and endogenous lectins and differentiation markers immunocytochemically.

In both normal epithelia and squamous cell carcinomas we detected differentiation-dependent expression of glycoligands for galectin-3. The level of α -2,3/6-sialylation, a key regulator (switch) for reactivity with tissue lectins, was also influenced by the cellular differentiation status. A subpopulation of cells with distinct features in this respect was discovered in carcinomas.

Functional relevance of these changes in glycan structure is proposed to be mediated by the ensuing modulation of lectin-carbohydrate interactions *in situ*.

This study was supported by Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, project No. MSM111100005 and Grant Agency of the Czech Republic, projects No. 304/02/0463 and 304/03/P027.

INAKTIVACE GENŮ BRCA1 A BRCA2 U SPORADICKÉHO KARCINOMU PRSU

Autorka: Mgr. Markéta Janatová

Školitel: Doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1.LF

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem v naší ženské populaci. Vyskytuje se v hereditární (5-10% případů) a sporadické formě. Příčinou většiny dědičných karcinomů jsou zárodečné mutace genů *BRCA1* a *BRCA2*. Kromě inaktivující mutace závisí vývoj nádoru i na ztrátě druhé, intaktní alely *BRCA*. U většiny karcinomů prsu, které vznikají v nepřítomnosti dědičné mutace, úloha genů *BRCA1/2* není dostatečně známa. Ztráty alel v lokusech *BRCA1* a *BRCA2* jsou sice častým nálezem, somatické mutace těchto genů se však podařilo prokázat jenom v ojedinělých případech.

V naší studii jsme se zaměřili na analýzu inaktivace genů *BRCA1/2* u 40 neselektovaných vzorků karcinomu prsu. Ztráta heterozygosity intragenových nebo v blízkosti genu ležících markerů byla využita k určení výpadku alel *BRCA1/2*. U vzorků se ztrátou heterozygosity jsme provedli mutační analýzu. Screening byl prováděn pomocí PTT (protein truncation test) analýzy a přímého sekvenování produktů RT-PCR. K potvrzení a charakterizaci mutací bylo použito sekvenování vhodných fragmentů PCR. Analýza genetického materiálu získaného z periferní nesrážlivé krve sloužila k odlišení zárodečných mutací.

Ztráta alely *BRCA1* byla prokázána u 8 nádorových vzorků (21%), ztráta alely *BRCA2* pak u 13 nádorů (33%). V genu *BRCA1* byly nalezeny dvě somatické mutace, způsobující zkrácení genového produktu a tím jeho inaktivaci. Jedná se o zatím nepopsané somatické mutace genu *BRCA1*. Při analýze produktů RT-PCR genu *BRCA2* bylo nalezeno 7 sestříhových variant. Vysvětlení, zda se jedná o alternativní genový sestřih nebo o důsledek inaktivující genové mutace, vyžaduje sekvenční analýzu prováděnou na úrovni genomové DNA.

Naše analýzy potvrzují úlohu somatických mutací u genu *BRCA1* a patrně i *BRCA2* v tumorigenezi. Ve shodě s výsledky dalších laboratoří jsou však somatické mutace těchto genů řídkým nálezem.

LYSOSOMÁLNÍ ENZYMOPATHIE: DYNAMICKÉ STUDIE ODBOURÁVÁNÍ SFINGOLIPIDŮ V KULTURÁCH NORMÁLNÍCH A MUTANTNÍCH BUNĚK

Autorka: Jana Keslová

Školitelka: RNDr. Jana Ledvinová, CSc., **konzultant:** RNDr. Befekadu Asfaw, CSc., Ústav dědičných metabolických poruch 1.LF a VFN

Sfingolipidy představují skupinu komplexních lipidů, které jsou charakteristickou součástí eukaryotické plasmatické membrány. Mají důležitou úlohu v mnoha biologických procesech, zejména při kontrole buněčného růstu, rozpoznávání a signalizaci. Degradace sfingolipidů probíhá v kyselém prostředí lysosomů postupným účinkem specifických hydrolas. Mutace v genech kódujících tyto enzymy nebo jejich proteinové aktivátory mají za následek poruchu katabolických mechanismů, vznik substrátových deposit v lysosomech a špatnou funkci buněčných systémů s velmi závažnými zdravotními následky pro pacienta.

Sfingolipidové aktivátorové proteiny (SAPs, saposiny A, B, C, D) jsou důležitými kofaktory hydrolas odbourávajících glykosfingolipidy s krátkými, maximálně trisacharidovými řetězci a ceramid. Defekt SAPs prekurzoru (prosaposinu) s následnou absencí všech saposinů vede ke komplexní sfingolipidose s hromaděním celé řady sfingolipidů v tkáních (sulfatidu, globotriaosylceramidu Gb₃Cer, galakto- a glukosylceramidu, laktosylceramidu, ceramidu a částečně GM3 gangliosidu).

Pro analýzu metabolických cest sfingolipidů se s úspěchem využívají dynamické studie na kulturách kožních fibroblastů s radioaktivně značenými substráty.

Tyto experimenty jsme v naší práci využili ke sledování dvou cílů:

1. Porovnat stupeň degradace několika radioaktivně značených sfingolipidů (³H]sulfatid, [³H]globosid, [³H]sfingomyelin, [³H]GM2 gangliosid) v buňkách s dědičnou poruchou katabolické funkce příslušného enzymu a v buňkách s deficitem prosaposinu.
2. Zjistit a porovnat účinek rekombinantních α-galaktosidas přidaných do kultivačního média, na odbourávání Gb₃Cer buňkami pacientů s Fabryho chorobou, a monitorovat tento proces pomocí triciem značených sfingolipidových markerů.

Naše studie ukázala, že:

1. Stupeň poruchy degradace sfingolipidů v důsledku nepřítomnosti proteinových aktivátorů (deficit prosaposinu) je podobný obrazu izolovaných enzymových deficitů u jednotlivých sfingolipidos, tj. Fabryho choroby (deficit aktivity α-galaktosidas A), pozdně-infantilní formy sulfatidosy (deficit arylsulfatasy A), Farberovy choroby (deficit kyselé ceramidasy) a týká se významně hromadění laktosylceramidu.

Obraz degradace GM2 v buňkách s deficitem prosaposinu však ukazuje neúplný blok na úrovni GM3 na rozdíl od buněk pacienta se sialidosou (nefunkční α-N-acetyl- neuraminidasa). Tento výsledek nasvědčuje, že spoluúčast saposinů na odbourávání GM3 *in vivo* není kritická.

2. Pro léčbu Fabryho choroby jsou v současnosti dostupné dvě rekombinantní α-galaktosidasy: Fabrazym™ (*agalsidase beta*, Genzyme) a Replagal™ (*agalsidase alfa*, TKT).

Po aplikaci těchto enzymů ke kultuře kožních fibroblastů pacientů s Fabryho chorobou jsme pomocí [³H]Gb₄Cer markeru (globosid, prekurzor substrátu Gb₃Cer) zjistili, že internalizace *agalsidase beta* byla ve třech liniích buněk s Fabryho chorobou vždy vyšší než u *agalsidase alfa*. Přesto je nutné zdůraznit, že oba enzymy jsou schopny velmi účinně odbourávat kritický substrát Gb₃Cer na méně polární produkty a mají tedy cílené terapeutické účinky.

Podporováno granty GAČR 303/03/H065 a MSM 111100003

IMUNOHISTOCHEMICKÉ MARKERY PRO DETEKCI APOPTÓZY PRIMÁRNÍCH POTKANÍCH HEPATOCYTŮ

Autoři: Tomáš Kučera, Nikolina Canová

Školitelé: Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc., Ústav pro histologii a embryologii 1. LF a Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF a VFN

Vliv různých látek s toxickými nebo léčebnými efekty na apoptózu jaterní buňky je významným hlediskem jejich působení. V rámci daného experimentu je důležité rozlišovat mezi programovanou buněčnou smrtí – apoptózou a nekontrolovaným rozvratem buněčného metabolismu končícím lýzou buňky – autolýzou. Pro detekci jsme použili tři imunohistochemické markery - protilátky proti aktivované kaspáze-3, aktivované kaspáze-9 a protilátku proti štěpenému laminu A - pro identifikaci spontánní apoptózy primárních potkaních hepatocytů. Výsledky jsme konfrontovali s morfologickým hodnocením buněk.

Pro morfologické hodnocení byly primární potkaní hepatocyty kultivované na krycím skle fixovány paraformaldehydem a barveny metodou hematoxylin-eosin. Pro EM byly buňky po fixaci v Karnovského směsi zalaty do Eponu. Byly zhotoveny ultratenké řezy a po dvojitém kontrastování vyšetřovány. Imunohistochemická detekce proběhla s využitím cleaved caspase-3 (Asp175) antibody, anti cleaved caspase-9 (Asp353) antibody (rat specific) a anti cleaved lamin A (Asp230) antibody



podle modifikovaného protokolu, který vycházel z doporučení výrobce (Cell Signaling Technology). Po vizualizaci s užitím DAB jako substrátu pro peroxidázu byla jádra dobarvena hematoxylinem.

Výsledek ukázal rozdílnou míru shody mezi jednotlivými imunohistochemickými metodami a hodnocením buněčné viability i buněčné smrti podle morfologických kritérií. Zatímco pozitivita pro aktivovanou kaspázu-3 byla detekovatelná pouze v buňkách s „typicky apoptotickými“ znaky, imunoreaktivita pro štěpenou kaspázu-9 a štěpený lamin A přetrvávala i v buňkách, zřejmě sekundárně nekrotických. Viabilní hepatocyty, i značná část nekrotických, byly však negativní pro všechny apoptotické markery.

Pro přesnou detekci apoptózy je nutno souběžně používat více metod, které postihují různé fáze apoptotického procesu. Morfologické srovnávací vyhodnocení však musí být provedeno vždy pro ověření správnosti výsledků.

REPLIKAČNÉ DOMÉNY A REPLIKAČNÉ OHNISKÁ

Autori: Ligasová Anna, Koberna Karel, Malínský Jan, Pliss A., Raška Ivan, Berezney R.

Školitel: RNDr. Karel Koberna, CSc., Ústav buněčné biologie a patologie 1. LF

Replikácia jadrovej DNA prebieha v subnukleárných miestach nazývaných replikačné ohniská, tvorených niekoľkými replikónmi a replikačnými faktormi. Veľkosť jednotlivých replikónov je rôzna, väčšinou sa pohybuje medzi 50-300 kbp. V tejto práci sme urobili detailnú svetelnomikroskopickú (SM) a elektrónmikroskopickú (EM) analýzu usporiadania replikovaného chromatinu HeLa buniek v priebehu S fázy bunkového cyklu. Zistili sme, že jadrový chromatin je v skorej S fáze replikovaný cez 1100 ± 80 replikačných ohnisk (RO, SM objekty). V ďalšom priebehu S fázy dochádza k zníženiu počtu RO a v neskoršej S fáze sme pozorovali maximálne 100 RO, ktoré však boli väčšie ako RO v skorej S fáze. V EM obraze bunkového jadra bol chromatin replikovaný pomocou replikačných domén (RD, EM objekty). Na rozdiel od RO bola veľkosť RD počas celej S fázy konštantná, takisto počet RD vykazoval ďaleko menšie rozdiely v priebehu S fázy. Počet RD bol v skorej a v strednej S fáze ~ 2100, v neskoršej S fáze sa znížil na ~ 1400. Je teda zrejme, že RO sú zložené z jednej alebo viacerých RD. Naše výsledky tiež ukazujú, že RD pretrvávajú aj po replikácii a počas nasledujúceho bunkového cyklu. Ich veľkosť je však menšia, čo zrejme odráža nutnosť dekonenzácie chromatinu v priebehu replikácie. Takisto bola veľkosť RD u buniek značených biotinylovaným deoxyuridinom počas 3 alebo 10 minút rovnaká. Preto predpokladáme, že RD predstavujú základné chromatinové jednotky replikácie.

VOLUMETRICKÉ MĚŘENÍ LÉZÍ V MOZKU U NEMOCNÝCH S NEUROPSYCHIATRICKÝM LUPUS ERYTEMATODES POMOCÍ MAGNETICKÉ REZONANCE.

Autoři: Lucie Linková, ²V. Peterová, ²J. Krásenský, ¹M. Olejárová, ²Z. Seidl, ²J. Daneš, ¹C. Dostál

Školitelé: Prof. MUDr. Ctibor Dostál¹, DrSc., As. MUDr. Věra Peterová², CSc., ¹Revmatologický ústav,

²Oddělení MR, Radiodiagnostické kliniky 1. LF a VFN

Studie porovnáva objem patologických ložisek mozku v obraze magnetické rezonance (MR) u 11 nemocných s neuropsychiatrickým lupus erytematodes (NPSLE) s různou klinickou manifestací v závislosti na věku, aktivitě nemoci vyjádřené pomocí Systemic lupus disease activity index (SLEDAI) a době trvání nemoci.

Metodika: 11 NPSLE pacientů (10 žen a 1 muž, \bar{x} věk 42 let) s rozdílnou klinickou symptomatologií a 11 pohlavím i věkem odpovídajících zdravých kontrol bylo vyšetřeno pomocí 1,5mm tenkých řezů mozku na MR 1,5T Philips v sekvenci Flow attenuated inversion recovery (FLAIR).

Výsledky: Celkový objem patologických ložisek u nemocných byl 9,56±6,3 cm³ a u kontrol 0,78±0,88 cm³. Po statistickém zhodnocení (T test) byl nalezen statisticky významný rozdíl (p<0,01) ve objemu lézí u obou skupin. Nenalezli jsme závislost na aktivitě nemoci. Slabě významná byla závislost na době trvání nemoci (p<0,5), statisticky významně byla prokázána závislost na době od výskytu prvních neuropsychiatrických projevů (p<0,01).

Závěr: Celkový objem patologických ložisek mozku u nemocných s NPSLE je statisticky významně vyšší oproti zdravým kontrolám. Z relativně malého souboru se neprokázala závislost objemu ložisek na aktivitě nemoci vyjádřené SLEDAI. Nalezena byla závislost na době trvání nemoci a zejména na době od výskytu prvních neuropsychiatrických projevů. Zde byl prokázán statistický nárůst objemu ložisek v závislosti na dobu výše zmíněných proměnných.

Práce vychází z výzkumného záměru MZČR 00000230728 Revmatologického ústavu a z výzkumného záměru CEZ J13/98: 1111.0000.1 - 206016 Neurologické kliniky.

STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF HUMAN COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE, AN ENZYME DEFICIENT IN HEREDITARY COPROPORPHYRIA

Author: Ivan Mikula

Advisor: Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Department of Pediatrics and Centre for Integrated Genomics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Heme acts as a prosthetic group for essential hemoproteins. Coproporphyrinogen oxidase (CPO) [E.C.1.3.3.3.] catalyzes the sixth step in heme biosynthesis. The inherited deficiency of CPO causes hereditary coproporphyrin (HC), inherited in an autosomally dominant fashion. To better understand heme biosynthesis and address the molecular pathology of HC,

we studied recombinant wild-type CPO (using a glutathione-S-transferase expression system) and two naturally occurring mutants (R331W and del390Gly). Wt-CPO and mutated-CPO were purified to electrophoretic homogeneity with specific activities of 4265 nmol/hr/mg protein (wt-CPO), 2100 nmol/hr/mg protein for R331W-CPO and a residual (<1%) activity for del390Gly-CPO. In its active form, human CPO is dimeric. According to the hydrodynamic properties derived from analytical ultracentrifugation, CPO has a nearly globular shape. Both mutation of CPO did not affect dimer formation and sedimentation properties, but led to a significant amount of tightly bound coproporphyrin (R331W), respectively no bound of coproporphyrin (del390Gly). The catalytic efficiency (Kcat/Km) of the R331W-CPO was four-fold lower than wt-CPO, the pI for R331W was 5.56 as compared to 6.40 for wt-CPO, but pH optima were similar (6.8 for wt-CPO, 6.6 for R331W-CPO). Similar characterization is in progress for the whole spectrum of naturally occurring mutants, which, together with our crystallization trials, will add to our knowledge of the molecular pathology of HC and heme biosynthesis. [Supported by Grant from MSMT of Czech Republic (LN 00A079) and grant Barrande].

LYMPHOGRAPHIC MAP OF THE BREAST

Authors: David Pavlišta, Oldřich Eliška, Markéta Dušková

Advisor: Doc. MUDr. M. Dušková, CSc., Klinika plastické chirurgie FNKV

Aim: To acquire a basic orientation and to map the lymphatic drainage of the breast. To simplify and improve the technique of targeted resection of the lymphatic vessels including the sentinel node, based on the functional anatomy of the breast.

Methods: A post mortem study was performed on 20 female cadavers of an average age of 75 years. After slow intradermal administration of Patent Blau into the periareolar region and the centers of the individual quadrants of the breast, the lymphatics were visualized and a careful resection of these lymphatics and lymph nodes was performed. The lymphatics were drawn onto a schematic map of the breast on a transparent sheet and afterwards a summation of all schematic maps was performed. A map of the lymphatic vessels of the breast was based on this summation.

Results: After subcutaneous administration of patent blue, the lymphatics of the breast demonstrated great variability. The subareolar plexus and draining sentinel node in the axilla, as well as one or two supplying lymphatics were clearly visualized. Administration of the contrast material into the center of the breast did not lead to visualization of lymph nodes in any of the cases. Despite great variability in the lymphatic drainage of the breast, there are one or two main collecting lymphatics which lead to one or several sentinel nodes located in the lower part of the lateral margin of the pectoralis major muscle at the level of the 3rd-4th rib.

Conclusion : The vasa lymphatica mammaria magna (large lymphatic vessels of the breast) play a dominant role in the lymphatic drainage of the breast. From the course of the lymphatic vessels it is evident that the breast cannot be divided into functionally separate segments. According to the lymphatic map of the breast, one can assume that in carcinoma of the breast it is the lymphatic drainage and not the localization of the tumor that plays a primary role in the development of metastases.

One cannot ignore the existence of alternative drainage pathways of the breast, but their role in the beginning of dissemination of tumor cells in comparison with the axilla is negligible. After administration of patent blue into the parenchyme of the breast, no lymphatics were visualized in any of the cases.

Intradermal administration of Patent Blau is a reliable and effective method of visualizing lymphatic vessels and the draining lymph nodes of the breast.

Due to the meandering course of lymphatics in the breast, we cannot underestimate the role of radiation therapy after breast conserving surgery.

JAK INFORMUJÍ O KOUŘENÍ ČESKÉ DENÍKY?

Autor: Jiří Pešina

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

Úvod: Kouření je nejvýznamnější preventabilní příčinou smrti na světě. Na nemoci způsobené tabákem umírá nyní v České republice kolem 22.000 osob ročně, to je přibližně 60 úmrtí denně. Postoje mediálních pracovníků ke kuřáckému chování jsou zásadní pro pravdivou informovanost občanů každého společenství a v našem státě, ve srovnání s některými západními státy, není situace v tomto směru příznivá.

Metodika: Byl proveden rozbor článků zabývajících se problematikou kouření, které vyšly v letech 1998 - 2003 v Lidových novinách na titulní straně a v příloze Zdraví. Podle obsahu byly články rozděleny do 14 kategorií. Ve sledovaném období vyšlo 166 článků zabývajících se kouřením. Celkem bylo zpracováno 567 normostran textů.

Výsledky: Z výzkumu je patrné propojení tabakismu s politickými otázkami. V období 1998 – 2001 převažovaly články informující o kouření jako vážném samostatném a rostoucím problému dnešní společnosti. Drtivá většina těchto článků obsahovala pouze strohé konstatování o škodlivosti kouření. V letech 2002 - 2003 se změnil trend, jakým média informovala o problematice kouření. V tomto období se psalo čím dál tím více o kouření v kontextu s tabákovou reklamou, která byla dávana do spojitosti s politickými otázkami a kauzami.

Závěr: Zveřejněné texty mají různou odbornou kvalitu obsahu, rozsah a relevanci. V zachycených textech převažují materiály, v nichž je téma kouření zastoupeno jen minimálně. Obsahu hodnocených textů dominuje tematika zdravot-



ních souvislostí kouření, následovaná snahou o osvětu. U specifických textů převažuje snaha informovat o protikuřácké politice. V celkovém pojetí textů dominuje především snaha plnit zpravodajské povinnosti na straně jedné a osvětové působení na veřejnost na straně druhé. Celkové vyznění článků má v souvislosti se snahou o kontrolu kouření důležitou informační úlohu směrem k široké veřejnosti a média se mohou velice efektivně zapojovat do kontroly kouření v České republice.

VLIV GALVANICKÝCH JEVŮ NA EXPRESI CD MOLEKUL A PROLIFERAČNÍ AKTIVITU LYMFOCYTŮ *IN VITRO*.

Autoři: Štěpán Podzimek, Jarmila Procházková, Karel Hána, Hana Kučerová, Jiřina Bártová
Školitelka: MUDr. Jarmila Procházková CSc., Výzkumný ústav stomatologický 1. LF a VFN

Úvod: Uvolňování kovových iontů z dentálních materiálů je podporováno galvanismem a může u vnímavých osob způsobit zdravotní problémy. Cílem práce bylo prokázat do jaké míry dokáží galvanické jevy ovlivnit živé buňky *in vitro*. Zkoumali jsme proto, jak proudy o intenzitě 3, 10 a 20 mikroampér a napětí 80, 200 a 300 milivoltů při časové zátěži 24 hodin ovlivňují proliferaci lymfocytů a expresi povrchových molekul buněk periferní krve CD 3, 19, 11a, 18, 69 a 95.

Metodika: Mononukleární buňky byly separovány z buffy coatu centrifugací na Ficoll-Paque gradientu. Buňky přítomné v interfázi byly odsáty a po opakovaném promytí spočítány a naředěny na koncentraci 10^6 buněk v mililitru. Poté byly buňky ovlivněny různou intenzitou proudu a napětí po dobu 30, 60, 120 minut a po 24 hodin. Proliferace lymfocytů byla měřena po stimulaci PWM, Con A a E.coli. Expresie povrchových molekul byla sledována FACSovou analýzou u vzorků s působením proudů a napětí po dobu 24 hodin.

Výsledky: Krátkodobé působení galvanických proudů a napětí (méně než 2 hodiny) neovlivňuje proliferaci lymfocytů na statisticky významné hladině. Pokles proliferace byl zaznamenán po 24-hodinovém působení proudů 10 a 20 mikroampér. Expresie povrchových molekul CD 19, 11a/18, 19/69 a 19/95 byla zvýšena po působení proudu 20 mikroampér. Působením proudů 3 a 10 mikroampér byla snížena expresie CD 3, 3/69 a 3/95. Expresie povrchových molekul CD 11a/18, 3/69 a 3/95 byla též snížena po působení napětí 80 mV. Působením napětí 200 a 300 mV byla snížena expresie CD 3, 19, 11a/18 a 3/95. Z výsledků vyplývá trend zvýšené expresie povrchových molekul působením proudu o velikosti 20 μ A a naopak snížené expresie působením napětí, především o velikosti 200 a 300 mV.

Závěr: Dlouhodobý vliv galvanismu může u vnímavých osob ovlivnit proliferaci lymfocytů a expresi povrchových molekul. Naše výsledky potvrzují hypotézu, že ústní dyskomfort nemusí být pouze subjektivním pocitem pacienta, ale bývá založen na skutečném buněčném dyskomfortu zprostředkovaném uvolňováním kovových iontů z dentálních materiálů na základě galvanických jevů.

Tato studie je podpořena grantem IGA MZ ČR č.NK 7722-3.

TKÁŇOVÁ A KLINICKÁ REAKCE PŘI PENTASACHARIDOVÉ PREVENCI, FÁZE I

Autor: Stanislav Trča

Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Krška, CSc., I. chirurgická klinika-břišní, hrudní a úrazová chirurgie 1. LF a VFN

Úvod: Arteriální a žilní tromboza jako projevy tromboembolické nemoci (TEN) jsou celosvětově udávány jako významná příčina dlouhodobé morbidit a mortality. V tomto sdělení je pozornost věnována žilní tromboze. Většina rizikových faktorů jejího vzniku se týká zpomalení toku krve a změn hemostázy. Další významnou příčinou trombozy je poškození stěny cévy. To vysvětluje, proč jsou chirurgické výkony vysoce trombogenní. Velká pozornost je věnována nadále molekule heparinu. Výzkum vedl k vytvoření pentasacharidového preparátu, vytvořeného plnou chemickou syntézou definovaných a identických entit.

Metodika: Sledovanou skupinou byli pacienti s operačně léčenou zlomeninou proximální třetiny stehenní kosti operovaných na I. chirurgické klinice VFN a I. LF UK v Praze v období 11/2001 – 2/2002. Farmakologická prevence TEN byla rutinně prováděna nefrakcionovaným (sk. 1, UHF) a frakcionovaným (sk. 2, LMWH) heparinem v běžných profylaktických dávkách. Srovnání se skupinami pacientů s farmakologickou prevencí krátkodobým - 1 týden (sk. 3) a dlouhodobým - 1měsíc (sk. 4) podáváním pentasacharidu – fondaparinu (Arixtra) v optimalizované dávce (2,5mg pro die). V první fázi prezentujeme zhodnocení hemostazeologického laboratorního screeningu (INR, APTT, TT, Fbg., AT III, D dimer, PLT). Sledování každého pacienta po dobu 1 měsíce. Metody statistického hodnocení: t-test, Mann – Witney Rank Sum test, F test.

Výsledky: Zaznamenán větší rozptyl u D-dimeru ve skupině 1 (UHF) a skupině 3 (pentasacharid krátkodobě) ve srovnání se sk. 2 (LMWH) a sk. 4 (pentasacharid dlouhodobě). Dále zaznamenáno signifikantní snížení trombocytů ve sk. 1 (UHF). Toto svědčí pro stabilnější hemostazeologický stav ve skupinách dlouhodobého podání pentasacharidu a LMWH.

Závěr: Dlouhodobá farmakologická prevence TEN LMWH a zvláště pentasacharidy se jeví jako vhodná metoda vzhledem k její účinnosti, bezpečnosti, statisticky signifikantně lepším výsledkům. Je jí možné po zácviu pacienta či ve spolupráci se službou domácí péče provádět dlouhodobě při domácím ošetření.

V otázkách žilního tromboembolizmu pak došlo od širokého rozšíření nefrakcionovaného heparínu (UFH) v prevenci a léčbě k vyvinutí diferenciací složek a frakcionaci nízkomolekulárního heparínu (LMWH), dnes dominantního preparátu v prevenci a dostupné i v řadě léčebných indikací, až k vyvinutí plně syntetického pentasacharidu.

Cíl: posouzení doby přetrvávání rizika a zhodnocení tkáňové odezvy při prevenci pentasacharidy.

Zařazení do skupin: dvojitě slepá studie. Hodnocení klinického stavu včetně hojení ran prostřednictvím skórování, komplexní laboratorní biochemická a hematologická monitorace, úplná monitorace předchrorbí.

Způsob léčby (druh výkonu, potřeba reintervence, antibiotika, imunoterapie, podání krevních náhrad a derivátů, další přidružená medikace). Způsob podání ve všech skupinách subkutánní injekcí.

Sledování klinického stavu včetně hojení ran, komplexní laboratorní biochemická a hematologická monitorace, monitorace předchrorbí, způsob léčby - druh výkonu, potřeba reintervence, antibiotika, imunoterapie, podání krevních náhrad a derivátů, další přidružená medikace.

Sledované laboratorní parametry:

– Le, KO + diff, kompletní biochemické vyšetření krve a moči.

– Renální funkce, jaterní testy.

– AT III, fibrinogen, APTT, TT, D-dimer kvantitativně.

Cytoadhesivní molekuly: ICAM-1, E-selectin, P-selectin, C3, anti Xa aktivita, IG .

kvantitativně, CD 14 kvantitativně v seru, IL-6.

Tyto budou hodnoceny:

1. předoperačně: při přijetí

2. pooperačně: do 6 hodin po operaci

7. - 8. pooperační den

27. - 32. pooperační den

Follow-up: po 4-5 týdnech statistické a klinické hodnocení, kromě uvedených monitorovaných hodnot, celkové zhodnocení hemostazeologické statusu a anamnézy v době studie.

CAENORHABDITIS ELEGANS HAS ONLY ONE α -GALACTOSIDASE AND α -N-ACETYL GALACTOSAMINIDASE ORTHOLOG

Authors: Jakub Sikora, Jana Hujová, Robert Dobrovolný, Dana Holanová

Advisors: Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc., RNDr. Jana Ledvinová, CSc, MUDr. Martin Hřebíček, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Human α -galactosidase A (α -GAL) and α -N-acetylgalactosaminidase (α -NAGA) are true paralogs sharing a common ancestral gene. Deficiencies of these enzymes cause two well-characterized human lysosomal storage disorders - Fabry (α -GAL deficiency) and Schindler (α -NAGA deficiency) diseases.

BlastP searches for orthologs of human α -GAL and α -NAGA revealed a single *C.elegans* gene (CeGAL/NAGA) with significant homology to both human genes.

We elucidated gene organization of CeGAL/NAGA by cDNA sequencing including 3' and 5' UTR. We performed phylogenetic analyses and homology modeling of CeGAL/NAGA based on 3D structure of chicken α -NAGA.

α -GAL and α -NAGA activity measurements in *C.elegans* mixed culture homogenate revealed presence of both enzyme activities. However, the α -GAL activity was completely inhibited by N-acetylgalactosamine – α -NAGA inhibitor.

To study the expression of CeGAL/NAGA in *C.elegans*, we created C-terminal GFP fusion of the whole CeGAL/NAGA ORF under the control of its natural promoter. Presence of CeGAL/NAGAGFP transgene was confirmed at the of gDNA, cDNA and protein levels. No GFP signal was observed under standard laboratory conditions. We have employed CON A and NH₄Cl treatment in order to alkalis lysosomal pH. Both methods resulted in distinct GFP signal in membrane bound compartment of coelomocytes. Immunofluorescence detection of GFP fusion protein showed transgene expression in muscle and in some cases in gut and vesicular compartments of ceolomocytes suggesting differential accessibility of tissues to alkalization treatment.

RNA interference assays directed against the CeGAL/NAGA employing combination of microinjection and feeding approaches have not so far revealed any abnormal phenotype.

The hypothesis of single ortholog in *C.elegans* was further supported by phylogenetic, homology modeling and biochemical analyses. We determined tissue expression and examined the effect of RNAi with the aim to evaluate *C.elegans* as a model organism for Schindler and Fabry diseases.

MUTATIONS IN SCO2 RESULT IN TISSUE-SPECIFIC CYTOCHROME C OXIDASE ASSEMBLY DEFECTS

Author: Lukáš Stibůrek, Kateřina Veselá, Markéta Tesařová, Hana Hansíková

Advisor: Prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Center of Integrated Genomics and KDDL, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital

Cytochrome c oxidase (COX) assembly factor *Sco2* presumably affects provision of Cu⁺ to Cu_A site of MTCO₂. We studied the interactions and levels of COX subunits in heart, skeletal muscle, liver, kidney and fibroblasts from 3 patients with COX deficiency and mutations in *SCO2* (two G1541A homozygotes and one C1280T/G1541A compound heterozygote). Methods: Activity of COX was determined spectrophotometrically. Interactions and levels of COX subunits were characterised by 1D-PAGE (native), 2D-PAGE (native/denaturing), SDS-PAGE and immunoblot analysis.



Results: The activity of COX was markedly decreased in heart and skeletal muscle but only mild decrease was found in liver and cultured fibroblasts. Tissue-specific COX assembly defects were found with decreased levels of holo-enzyme complex and increased levels of specific assembly intermediates. In the liver and fibroblasts, most of the relevant cross-reactive material was located in holo-enzyme spots whereas in heart and skeletal muscle were detected severely decreased levels of holo-enzyme and markedly increased levels of assembly intermediates. Heart and skeletal muscle contained three major faster migrating assembly intermediates: the first one comprised only MTCO1, the second MTCO1, COX4 and COX5A and the third contained at least MTCO1, COX4, COX5A and MTCO2. The tissues from C1280T/G1541A heterozygote showed apparently more severe assembly defects and lower steady-state levels of COX subunits than tissues from G1541A homozygotes. Conclusions: We demonstrate that tissue-specific decrease in COX activity in patients with *SCO2* mutations is associated with similar extent of tissue-specific COX assembly impairment resulting in decreased levels of holo-enzyme complex and increased levels of assembly intermediates.

Supported by GACR-303/03/H065.

VLIV KANABINOIDŮ NA VLASTNOSTI BUNĚČNÉ MEMBRÁNY

Autorka: Marie Velenovská

Školitel: RNDr. Zdeněk Fišar, CSc., Psychiatrická klinika 1. LF a VFN

V účinných řadě biologicky aktivních látek hrají úlohu membránové lipidy, neboť značná část membránových proteinů vyžaduje pro svou správnou funkci specifické interakce s určitými lipidy či cholesterolem. Lipidová dvojvrstva se uplatňuje jako zásobárna amfifilních a lipofilních látek a její vlastnosti mají mj. vliv na dostupnost specifických vazebných míst receptorů a stav iontových kanálů. Kanabinoidy jsou psychoaktivní látky rozpustné v tucích. V našem projektu byla testována hypotéza, podle níž má užívání marihuany vliv na dynamické vlastnosti lipidové dvojvrstvy a tím i na aktivitu membránových proteinů zapojených do transmembránového přenosu nervového signálu. Byla získána a porovnána data 20 kuřáků marihuany a 20 kontrol, charakterizující některé jejich kognitivní funkce a byli u nich stanoveny tyto parametry: aktivita přenašeče pro serotonin v trombocytech, aktivita Na^+K^+ -ATPázy v erythrocytech a fluidita plazmatických membrán erythrocytů. U osob zneužívajících kanabinoidy jsme zjistili zvýšenou aktivitu SERT (přenašeče pro serotonin), sníženou aktivitu Na^+K^+ -ATPázy a horší výsledky v kognitivních testech. Při stanovení fluidity plazmatických membrán jsme nezjistili statisticky významný rozdíl.

Objasnění vlivu kanabinoidů na vlastnosti buněčných membrán může přispět k diskusi kolem endokanabinoidního systému, který by pravděpodobně mohl hrát roli při léčbě některých onemocnění (např. Parkinsonovy nemoci, roztroušené sklerózy, zvýšeného nitroočního tlaku aj.).

PORUCHA CYTOCHROM C OXIDÁZY U DÍVKY S FENOTYPEM WERNIG-HOFFMANOVY NEMOCI A S NOVOU MUTACÍ 1519DELA VE *SCO2* GENU

Autoři: Kateřina Veselá, Hana Hansíková, Milan Elleder

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Zeman DrSc., Centrum Integrované Genomiky a KDDL 1.LF a VFN

U některých případů s podezřením na spinální muskulární atrofii (SMA) byla nalezena deficeience cytochrom c oxidazy (COX). V našem sdělení předkládáme výsledky biochemických a molekulárních analýz u dívky s fenotypem Werdnig-Hoffmanovy nemoci a COX deficiencí. Dívka se narodila ve 34 týdnu gestace, Apgar skóre byl 4 a 7 v první a páté minutě. Laryngeální stridor a progresivní hypotonie vedly již v neonatálním období k těžké dyspnoi. Kardiologické vyšetření ukázalo počínající kardiomyopatii. Dívka byla intubována a trvale ventilována na novorozenecké jednotce intenzivní péče, kde zemřela ve věku 4 měsíců. Progresivní průběh onemocnění vedl k podezření na Werdnig-Hoffmanovu chorobu, ale molekulární analýzy SMA I genu byly negativní. Aktivity cytochrom c oxidázy byly v izolovaných svalových mitochondriích získaných ze svalové biopsie ve třetím měsíci věku významně sníženy, zatímco v kultivovaných fibroblastech byla aktivita COX snížena jen mírně. Aktivity ostatních enzymů dýchacího řetězce (komplexů I, II a III) byly v normě. Sekvenování COX asemblační genu *SCO2* ukázalo, že dívka je složený heterozygot pro běžnou mutaci G1541A (E140K) a pro novou, dosud nepopsanou mikrolepci 1519delA, která má za následek posun čtecího rámce a vznik pozměněného a zkráceného proteinu. Náš případ dokumentuje, že mutace ve *SCO2* genu se mohou projevit v neonatálním období hypotonií s SMA fenotypem. *SCO2* gen by proto měl být analyzován u dětí s podezřením na SMA, u kterých byly molekulární analýzy SMA genu negativní.

Práce vznikla s podporou projektů: GAČR 303/03/H065 a GAČR 303/03/D132

APOLIPOPROTEIN E IN PATIENTS WITH RETT SYNDROME FROM CZECH AND SLOVAK REPUBLICS

Autorka: Daniela Záhoráková

Školitel: Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc; Department of Pediatrics and Centre of Integrated Genomics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital

Background: Apolipoprotein E (apoE) is a polymorphic plasma protein which plays an important role in the lipoprotein metabolism. ApoE is associated with VLDL-, IDL-, and HDL-chylomicrons and it is the primary compound of lipoproteins

of the CNS. There are three common isoforms of apoE: apoE2, apoE3 and apoE4 and apoE3 is the most frequent in general population. It was suggested, that apoE2 has neuroprotective and antioxidant effects. The frequency of apoE4 is significantly higher in patients with disorders of lipoprotein metabolism and neurodegenerative disorders, for example in Alzheimer's disease or in the loss of cognitive functions. Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder with unfavourable prognosis affecting almost exclusively females. RTT is in 99.6% of cases caused by „*de novo*” mutations in *MECP2* gene. The aim of our study was to analyse the frequency of apoE2, apoE3 and apoE4 in our group of 48 girls with RTT.

Methods: Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes and used to amplify the analysed sequence of the *APOE* gene. PCR products were analysed by RFLP.

Results: We found a statistically significant difference in the frequencies of apoE isoforms between RTT patients and the control population. Allele ϵ 4 encoding isoform apoE4 was more common in RTT patients. On the contrary, allele ϵ 3 encoding apoE3 was less frequent in RTT patients than in the control population.

Conclusions: To date, no study concerning the higher apoE4 occurrence in patients with Rett syndrome was published. If future studies confirm our observation, therapeutic intervention, especially in ϵ 4/ ϵ 4 homozygotes with RTT could be considered.

(Supported by grant MŠMT LN00A79.)

KOMPLEXNÍ GENOMICKÁ PŘESTAVBA GENU BRCA1 JAKO PREDISPONUJÍCÍ ALTERACE PRO VZNIK KARCINOMU OVARIA

Autor: Michal Zikán

Školitelé: As. MUDr. Petr Pohlreich, CSc., Doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF

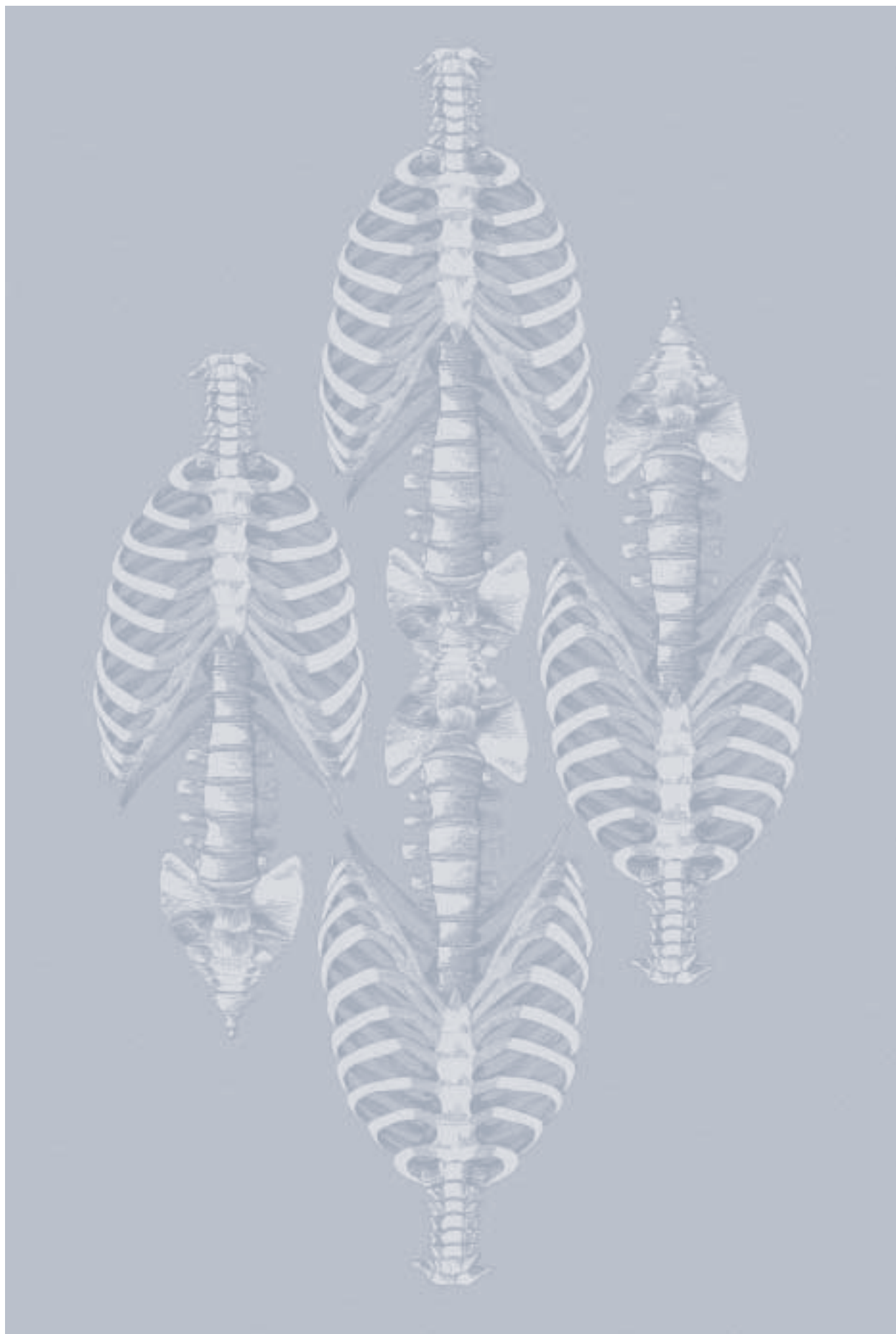
Určitá část, 5-10%, všech karcinomů prsu a vaječníků vzniká na dědičném základě. Tři čtvrtiny případů těchto hereditárních karcinomů prsu souvisí s přítomností alterací predisponujících genů s vysokou penetrancí – *BRCA1* a *BRCA2* (17q21 a 13q12-13).

Gen *BRCA1* patří k tumor supresorovým genům a je spoluzodpovědný za udržování genomové stability. Příčinou predispozice k malignímu nádorovému onemocnění je přenos zárodečné mutace inaktivující jednu z alel (kopií) odpovídajícího genu. V cílové tkáni vede pak následná genetická změna (většinou ztráta druhé intaktní alely) k inaktivaci genu, která iniciuje tumorogenezi, např. v důsledku genomové nestability spojené se vznikem dalších mutací.

Dosud je známo několik set hereditárních mutací genu *BRCA1*. Kromě bodových mutací jsou zde popisovány i velké genomové přestavby rozsáhlých oblastí genomové sekvence. Tyto změny probíhají především v oblastech Alu repetitivních sekvencí (až 41% genomové sekvence genu *BRCA1*) a jejich podíl na všech alteracích genu *BRCA1* je v západoevropské populaci uváděn v rozmezí 15-36%.

Zde prezentujeme pacientku s karcinomem ovaria ve věku do 40 let, která byla indikována k provedení mutační analýzy genů *BRCA1* a 2. Protein truncation test a následná sekvenační analýza odhalily výpadek exonů 21 a 22, které se podílejí na stavbě funkčně nezbytné interakční domény genového produktu. Přestože se jedná o in-frame delecii, je třeba ji považovat za alteraci postihující funkci genového produktu. Následná analýza genomové DNA odhalila velkou genomickou delecii 3,8 kb zahrnující exony 21 a 22, doprovázenou inverzní inzercí krátkého úseku a kratší delecí na začátku 20. intronu. Změny byly pravděpodobně způsobeny chybnou homologní rekombinací v oblasti repetitivní Alu sekvencí.

Jedná se o první takovouto komplexní přestavbu genu *BRCA1* odhalenou v populaci střední a východní Evropy.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY

- Doležal Ondřej, MUDr.
- Havlová Zuzana - Teuberová, MUDr.
- Hrubý Tomáš, MUDr.
- Fialová Markéta, Mgr.
- Frýdlová Jana, Mgr.
- Kasperová Martina, MUDr.
- Mikšovský Martin
- Milotová Martina, Mgr.
- Novotná Lenka, Mgr.
- Seydlová Michaela, MUDr.
- Svobodová Helena, Mgr.
- Šimůnek Petr, MUDr.
- Trnečková Lenka, Mgr.
- Zatloukalová Eva, Mgr.

Hodnotitelská komise

- Předseda:** Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
Členové: Prof. RNDr. František Víték, DrSc.
Doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.

T1 LESION LOAD A JEHO VZTAH KE KLINICKÉMU STAVU A PREDIKTIVNÍ HODNOTA U PACIENTŮ S ROZTROUŠENOU SKLEROSOU MOZKOMÍŠNÍ.

Autor: Ondřej Doležal

Školitelka: Doc. MUDr. Eva Havrdová, CSc., Neurologická klinika 1. LF a VFN

Úvod: Práce se zaměřuje na zhodnocení spolehlivosti NMR zobrazování v otázce klinického stavu pacientů s RS a vývoje tohoto stavu ve smyslu progresu onemocnění. Práce se snaží nabídnout alternativu v hodnocení NMR sekvencí v podobě T1 hypointenzních lézí jako kompromis mezi dvěma již v praxi používanými technikami - atrofií a Flair lesion loadem

Metodika: V projektu jsme použili soubor 28 pacientů s verifikovaným onemocněním RS. Doba sledování byla 4 roky. Jako hlavní NMR hledisko jsme zdůraznili množství lézí v T1 vážených obrazech (T1 lesion load), které se jeví dle několika zahraničních prací jako nejspolehlivější a ve vztahu ke klinickému stavu pacienta nej přesnější ukazatel. Pacienti byli sledováni před zahájením studie, 1 rok a posléze 3 rok a na závěr ve po 4 letech.

Výsledky: 60 % pacientů se stabilním či zhoršujícím se EDSS odpovídá 68 % pacientů se stoupajícím T1 lesion loadem. Nárůst T1 lesion load u tohoto procenta pacientů ve 3. roce sledování je v korelaci s nárůstem disability (EDSS) ve 4. roce pozorování u 21 % pacientů. Vývoj T1 lesion loadu pozvolna následuje u většiny pacientů trend Flair lesion loadu (N 28, p value <0,001), který nastupuje jako první ukazatel postižení CNS.

Závěr: Práce prokázala, že T1 lesion load je validním ukazatelem destruktivních změn v CNS u nemocných s RS. T1 lesion load je prediktivním faktorem klinického stavu pacientů. Byla potvrzena původní hypotéza o posloupnosti chorobných změn v přechodu od zánětlivých ukazatelů (Flair) k destruktivním změnám (Atrofie, T1 lesion load).

T1 lesion load se zřejmě velmi rychle stane pomocným kriteriem v hodnocení stavu a predikce dalšího vývoje onemocnění v klinické praxi. K přesnějšímu odhadu vývoje a k získání vyšší statistické významnosti je třeba práci rozšířit na větší počet pacientů a sledovat vývoj stavu v delším časovém úseku. Vzhledem k chronicitě a z klinické praxe dobře známé nepředvídatelnosti onemocnění je však do budoucna nalezení přesnějšího morfologického ukazatele s určitou prediktivní hodnotou pro další vývoj onemocnění zcela nezbytné.

TITANOVÝ TERČÍK MODIFIKOVANÝ HYDROXYAPATITEM A ZIRKONEM NEVYKAZUJE ZNÁMKY CYTOTOXICITY

Autoři: Zuzana Havlová, Michaela Seydlová, Miroslav Jelínek, Barbora Dvořánková

Školitelka: Prof. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc., MBA, Stomatologická klinika 1. LF a VFN

Velmi diskutovanou problematikou v oblasti implantologie je povlakování implantátů. Nejčastěji používaným materiálem k povlakování je hydroxyapatit. Všeobecnou snahou je získat takový povrch implantátů, který by zlepšoval oseointegraci a umožnil tak rychlejší zatížení implantátu.

Na titanových terčících Ti6Al4V s laserově deponovanou vrstvou hydroxyapatit o tloušťce 6-12μm s mezivrstvou zirkonia 50-70nm byly ve spolupráci s Fyzikálním ústavem Akademie věd provedeny testy k zjištění složení vytvořené vrstvy – XRD a SEM. V pokusu in vitro byl dále proveden přímý test cytotoxicity. Hodnotící metodou byl celkový počet myších a lidských fibroblastů.

Výsledkem je zjištění, že materiál nejeví známky cytotoxicity a buňky v jeho okolí nevykazují žádné morfologické změny při pozorování v optickém mikroskopu.

SROVNÁVACÍ STUDIE, P 300 U NÁSILNĚ, IMPULZIVNĚ SE CHOVAJÍCÍCH DELIKVENTŮ

Autoři: Hrubý Tomáš, Žukov Ilja, Kozelek Petr, Fridrich Pavel, Harsa Pavel

Školitel: Doc. MUDr. Ivo Paclt, CSc., Psychiatrická Klinika 1. LF a VFN

Úvod: Kognitivní evokované potenciály jsou jednoduchou neinvazivní neurofyziologickou metodou, která je schopna postihnout některé aspekty kognitivního zpracování informace u člověka. Nejznámější a nejdůležitější komponentou kognitivních evokovaných potenciálů je tzv. vlna P3. Změny její latence, amplitudy a topografie jsou popsány u širokého spektra onemocnění. Mimo jiné byly změny parametrů vlny P300 nalezeny některých poruch osobnosti a jedinců s impulzivně agresivním jednáním. Většina autorů se však shoduje v tom, že snížená amplituda vlny P300 je typická pro impulzivně násilné agresory, zatímco prodloužená latence byla častěji popisována u jedinců s plánovaným či jiným typem agresivity. A zde byla nalezena i korelace míry násilného chování s latencí vlny P300, která je předpokládaným ukazatelem rychlosti kognitivního zpracování, případně jeho poruchy právě u těchto osob. Je tedy pravděpodobné, že existuje nějaký specifický deficit v kognitivním zpracování u těchto osob. Metodika: Cílem studie bylo zjistit jaké změny parametrů vlny P300 se objevují u jedinců, kteří byli, m.j. pomocí dotazníků Eysenck IVE, zařazeni jako impulzivní oproti jedincům neimpulzivním. Záznam kognitivních evokovaných potenciálů, konkrétně vlny P300 byl proveden u 10 delikventů hodnocených jako impulzivně agresivní (na základě studia mechanismu trestného-násilného činu, anamnézy) a zároveň u 10 zdravých, osob věkově párovaných a vzájemně porovnaných, průměrný věk zkoumaných osob byl 35 let. Jedinci zařazeni do studie byli z hlediska psychiatrického a neurologického zdraví a skóre MMSE bylo rozmezí 30-28 bodů. Ve studii byla vyšetřena vlny P300 ve sluchové modalitě při použití dvou interstimulačních intervalů, 2 a 3 vteřiny. Byly porovnány amplitudy a latence vlny P300 v oblasti elektrody Pz u obou skupin, statistická analýza byla provedena

pomocí studentova T-testu. Výsledky: Průměrná amplituda u zdravých jedinců byla 7,8, zatímco u osob zařazených jakou impulzivní agresori byl průměr 4,4. Výsledky ukazují na statisticky významně sníženou amplitudu u jedinců diagnostikovaných jako impulzivní agresori ($P < 0.05$), zatímco v latenci nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Tyto výsledky tak podporují teorii existence určitého specifického pozornostního a kognitivních deficitu u delikventů s impulzivně agresivními vzorci chování.

LOKALIZACE AKTIVNÍCH RIBOZOMÁLNÍCH GENŮ V HELA BUŇKÁCH

Autoři: M. Fialová, K. Koberna, J. Malínský, A. Pliss, M. Mašata, J. Večeřová, M. Bednár a I. Raška.
Školitel: Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., Laboratoř buněčné biologie, Ústav experimentální medicíny Akademie věd ČR a Ústav buněčné biologie a patologie 1. LF

V této studii jsme se zaměřili na lokalizaci transkripčně aktivních ribozomálních genů. Pro jejich lokalizaci jsme použili in situ hybridizační přístupy a techniku založenou na detekci vznikajících ribozomálních transkriptů. Světelně mikroskopické výsledky ukázaly, že ribozomální geny jsou lokalizovány do 10 až 40 fluorescenčních ohnisek. Většina z nich vykazovala transkripční aktivitu. Prokázali jsme, že jadérová ohniska odpovídají fibrilárním centřům (FC) a denzím fibrilárním komponentám (DFC). Pomocí elektronové mikroskopie jsme transkripční signál lokalizovali do DFC a do hraniční oblasti mezi DFC a FC. Transkripční signál byl tvořený shluky zlatých částic. Tyto shluky jsme ztotožnili s morfologickými koreláty „vánočních stromků“ v DFC. Stereologické výsledky ukázaly, že ribozomální transkripční jednotka je kompaktní 4 až 5,5 krát.

MĚŘENÍ TĚLESNÉ HMOTNOSTI POMOCÍ KALIPERU A POMOCÍ VÁHY NA PRINCIPU BIOIMPEDANCE.

Autorka : Martina Kasperová
Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Vilikus, CSc., Ústav tělovýchovného lékařství 1. LF a VFN

ÚVOD: Procento tělesného tuku je možno měřit různými metodami. V poslední době se k tomuto účelu velmi často používá osobních vah založených na principu bioimpedance. Otázkou však je přesnost a spolehlivost takových měření. **CÍL:** Porovnat výsledky měření tělesného složení pomocí bioimpedanční váhy s klasickou metodou měření procenta tělesného tuku pomocí kaliperace. Kaliperace je považována za nejspolehlivější metodu a proto jsme jí použili jako referenčního standardu. **METODIKA:** Vyšetřili jsme tělesné složení u 50 osob (24 mužů a 26 žen) průměrného věku 42,4 ± 10,7 roku jednak metodou kaliperace a jednak pomocí bioimpedanční osobní váhy. Výsledky jsme porovnali dvouvýběrovým párovým t-testem na střední hodnotu pomocí tabulkového procesoru Excel. **VÝSLEDKY:** Zjistili jsme, že průměrná tělesná výška vyšetřených osob byla 172,1 ± 9,2 cm, průměrná tělesná hmotnost 72,2 ± 13,4 kg a tělesný tuk 21,19 ± 5,43 % při měření kaliperem a 24,74 ± 7,58 % při měření impedanční metodou. Rozdíl činil průměrně 3,6 % tuku, směrodatná odchylka rozdílů byla 4,1 % tuku. Tento rozdíl byl statisticky vysoce významný ($p = 7,62 \times 10^{-8}$). Krajiní diskrepance se pohybovaly v rozmezí od - 3,0 % do + 13,1 % tělesného tuku. **ZÁVĚRY:** Zjistili jsme, že při měření tělesného složení osobní vahou na principu bioimpedance, je výsledek zatížen průměrným nadhodnocením 3,6 % tělesného tuku. Měření tuku však může být nadhodnoceno až o 13,1 % případně podhodnoceno až o 3,0 %. Podle našich výsledků jsou měření založená na principu bioimpedance velmi nepřesná a nehodí se ani k orientačnímu posouzení tělesného složení.

EVALUATION OF MICRODENTISTRY TECHNOLOGIES IN THERAPY OF EARLY CARIES LESION

Author: Martin Mikšovský
Advisor: Doc. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc., Výzkumný ústav stomatologický 1. LF a VFN

OBJECTIVES: The Czech dental trade offers wide range of microdentistry devices. But their use in dental offices is limited. The main goal of this study is to compare single microdentistry technologies from the point of view of time-consuming of treatment, level of pain and on SEM pictures hard dental tissues after preparation.

METHODS: In study we used air abrasion device RONDOflex (KaVo)–pressure 3,2 bar, Al₂O₃ particles size 27 μm, air scaler SONICflex (KaVo), special microdentistry burs Fissurotomy (SSWhite). In this study was in vivo treated 276 human molars (142 patients, 1–3 molars each) with fissure caries at a DEJ depth of roughly similar size determined by radiographs and clinical examination. The treatment was provided by two dentists. Teeth was divided into four groups. Group 1 was treated in classical way according Black by conventional rotary handpiece with green marked diamond. Group 2 was treated with air abrasion, group 3 with oscillating device and group 4 with Fissurotomy burs. The restoration material in group 1 was amalgam. Cavities in groups 2,3 and 4 were filled with flow composite Flow line (Kulzer). At each appointment, when the restorative treatment was completed, patients were instructed to rate their pain on the special 5-degree scale (1 is completely painless, 5 require anesthetics). Time requirement was measured during each treatment from starting preparation to the end of finishing of filling. All data was registered and statistically evaluated (Student t-test).



RESULTS: Average time required for classical preparation with amalgam filling was 6 min 35 s. Micropreparation provided by Fissurotomy burs with flow composite filling required 7 min 15 s, by SONICflex consumed 8 min 55 s and by RONDOflex 10 min 5 s. In inverse order was registered level of pain. Preparation by RONDOflex was completely painless. SONICflex and Fissurotomy preparation were approximately on the same level of painfulness. The highest degree of painfulness was registered in classical rotary preparation. SEM pictures shows that air abrasion and oscilating systems resulted in less trauma to adjacent tooth surfaces than rotary preparation.

CONCLUSIONS: This study clearly shows that microdentistry approach do not take so much time in comparison to classical preparation. Benefits resulting from gentle approach to soft dental tissue and lower level of pain were accepted by patients in positive way. Patients in our offices were ready to pay for this advantages.

Institution grant VÚS-VFN No. 0002377901

DEGENERACE NEURONÁLNÍCH BUNĚK HIPPOCAMPU PO PRENATÁLNÍ EXPOZICI 20% ETHANOLU

Autorka: Martina Milotová

Školitel: Prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc., Fyziologický ústav 1. LF

Úvod: Experiment směřuje k objasnění vlivu ethanolu, jako neurotoxické látky, na vývoj populací neuronálních a gliálních buněk v hippocampu. Tato studie by mohla přispět k objasnění poškození mozku v perinatálním období.

Metodika: V tomto experimentu jsme podávali 20%-ní roztok ethanolu březím samicím laboratorních potkanů typu Wistar /od 1. dne březosti/ v dávkách 2g ethanolu na 1 kg živé váhy. Účinná látka byla aplikována denně, od prvního do posledního dne březosti. /21 dnů březosti/. Po porodu již nebyla mláďata vystavena postnatální expozici ethanolu. Zvířata byla usmrcena 35. den postnatálního vývoje v hluboké pentobarbitalové narkóze, transaortálně perfundována (neutrálním paraformaldehydem), jejich mozky vyjmuty a zpracovány na kryostatu. Následně byly řezy obarveny kombinací DNA barvení Hoechst a Fluoro-Jade B (to umožňuje identifikovat zanikající neurony). Preparáty byly hodnoceny ve světelném mikroskopu.

Výsledky: U zvířat usmrcených 35. den postnatálního vývoje jsme se především zaměřili na morfologické změny v CA3 oblasti hippocampu. V této oblasti bylo možné pozorovat skupiny stále degenerujících buněk. Dále jsme tu identifikovali buňky s jemně granulovanými jádry a velké množství glie.

Závěr: U zvířat usmrcených 35. den postnatálního vývoje, které byli vystaveny prenatální expozici 20%-ního ethanolu, byly v CA3 oblasti hippocampu jasně patrné morfologické změny neuronálních a gliálních buněk. Pozoruhodné bylo zjištění, že i třicet dní od prenatální expozice 20%-ního ethanolu, zde bylo možné pozorovat ještě degenerující buňky, což svědčí o nastartování určitého procesu, pravděpodobně apoptózy. Apoptickému mechanismu zániku neuronálních a gliálních buněk by nasvědčovala i identifikace buněk s jemně segmentovanými jádry. V ostatních oblastech hippocampu bylo také možné pozorovat morfologické změny neuronálních a gliálních buněk.

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE PRASEČÍHO PEPSINU A NA 8-HYDROXYCHINOLINU

Autorka: Lenka Novotná

Školitelka: Ing. Zdenka Kučerová, CSc., Ústav patologické fyziologie 1. LF

Pepsiny patří mezi aspartátové proteinázy, které jsou syntetizovány žaludeční sliznicí ve formě inaktivních prekurzorů – pepsinogenů. V lidské žaludeční sliznici se nachází dva typy pepsinogenů (PGA, PGC), jejichž vzájemný poměr má vztah k poruchám struktury a funkce žaludeční sliznice.

Afinitní chromatografie je separační technika používaná k izolaci a charakterizaci biomakromolekul. Principem této metody je schopnost biologicky aktivních látek reversibilně tvořit specifické komplexy s jinými složkami (ligandy). V průběhu této chromatografie nedochází k denaturaci biomakromolekul.

Byla připravena vysokotlaká afinitní stacionární fáze obsahující 8-hydroxychinolin (8-HQ) jako ligand. Modelovým proteinem byl zvolen prasečí pepsin A. Byly optimalizovány chromatografické podmínky pro adsorpci a eluci pepsinu na 8-HQ – byl zkoumán vliv pH, koncentrace, iontové síly a složení promývací a eluční mobilní fáze. Dále byla určena kapacita stacionární fáze pro pepsin, reprodukovatelnost analýz a kalibrační křivka. Dosažené výsledky byly potvrzeny stanovením aktivity pepsinu dle Ansona a Mirskyho.

Získané výsledky potvrzují možnost použití afinitní chromatografie na 8-HQ pro izolaci pepsinu.

MYŠÍ A LIDSKÉ FIBROBLASTY KOLONIZUJÍ TITANOVÝ TERČÍK MODIFIKOVANÝ HYDROXYAPATITEM A ZIRKONEM

Autoři: Michaela Seydlová, Zuzana Havlová, Barbora Dvořánková

Školitelka: Prof. MUDr. Tatjana Dostálová, DrSc., MBA, Stomatologická klinika 1. LF a VFN

Dentální implantologie je obor procházející v dnešní době velkým rozvojem. Snahou je nejen rozšířit indikace, ale i s tím související hledání nových možných kombinací materiálů vhodných pro implantaci.

V našem pokusu byl jako model implantátu zvolen terčík z titanové slitiny s laserově deponovanou tenkou vrstvou hydroxyapatitu s mezivrstvou zirkonia pro zlepšení vazby. V biologickém pokusu byly provedeny testy adheze a proliferace s myšími 3T3 a lidskými HF8 liniovými fibroblasty in vitro.

Zhodnocením testů jsme došli k závěru, že dané fibroblasty povrch terčíků nejenže kolonizují, ale i na něm rostou a aktivně se množí.

MUTAČNÍ ANALÝZA V GENU PRO APOLIPOPROTEIN B U ČESKÉ POPULACE OBÉZNÍCH DĚTÍ A OSOB S DIAGNÓZOU ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ

Autoři: Helena Svobodová, Ivan Mazura, Richard Češka

Školitel: Doc. MUDr. Richard Češka, CSc., III. interní klinika-klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF a VFN

Apoproteiny, bílkovinné složky lipoproteinových částic, jsou kofaktory enzymů účinných v lipoproteinovém metabolismu, zprostředkují vazbu lipoproteinové částice na specifické receptory, účastní se přenosu nebo výměny lipidových částic mezi jednotlivými lipoproteiny. Apoprotein B je strukturální pro chylomikrony, VLDL, IDL, LDL, je ligandem pro LDL receptor. Testovaným polymorfizmem v tomto genu byla inserce či delece 3 hydrofobních aminokyselin leucin-alanin-leucin v signálním peptidu genu, které mohou mít přímý efekt na hladiny plazmových lipidů. Druhým testovaným polymorfizmem je tranzice cytozinu (C) thyminem (T) v pozici -265 v promotoru genu. Jde o polymorfismus délky restričních fragmentů. Aminokyselinová záměna má vliv na hladiny apoproteinu B a LDL cholesterolu. Vyšetřované soubory tvoří 51 pacientů z II. interní kliniky VFN trpících aterosklerózou (Kardio), 63 dětí s obezitou II. stupně (Ob II), 36 dětí s obezitou III. stupně (Ob III) z Dětské léčebny Dr. Filipa v Poděbradech zaměřené na redukci hmotnosti. Použitou metodikou je izolace DNA z krve, zjištění koncentrace a čistoty DNA, ředění DNA na pracovní koncentraci, polymerázová řetězová reakce, elektroforetická analýza DNA, restriční analýza, statistické zpracování dat. Z výsledků vyplývá, že v souboru Kardio jsou hodnoty LDL vyšší ve skupině genotypů bez alely T oproti skupině genotypů s alelou T. V souboru Ob II jsou hodnoty LDL a apoproteinu B vyšší ve skupině mužů než ve skupině žen. Hodnoty celkového cholesterolu jsou vyšší ve skupině mužů než ve skupině žen. Hodnoty apoproteinu B jsou vyšší ve skupině genotypů bez alely T oproti skupině genotypů s alelou T. U souborů Ob II a Ob III nebyl nalezen genotyp TT. U 150 jedinců byla provedena analýza 2 genetických polymorfimů v genu pro apoprotein B, celkem tedy 300 analýz. S větším počtem sledovaných jedinců by se mohlo podařit objevit nové vztahy a závislosti mezi genotypem a lipidovým metabolismem jedinců, případným rozvojem aterosklerózy. Vznikla by také možnost porovnávat soubory mezi sebou.

HYBRIDNÍ NÁHRADY KOTVENÉ IMPLANTÁTY A ZUBNÍMI PILÍŘI

Autoři: Petr Šimůnek, Prokop Radina

Školitelka: Prof. MUDr. Tat'jana Dostálová, DrSc., MBA, Stomatologická klinika 1.LF a VFN

Klíčová slova: hybridní náhrada, dentální implantáty, zásuvné spoje

Použití implantátu/ů jako kotveního prvku snímatelné náhrady představuje metodu, jak vyřešit problematickou retenci, a to zejména u náhrady celkové. V případě bezzubé dolní čelisti je popsána dlouhodobá klinická úspěšnost už při použití dvou implantátů, obvykle zavedených do oblasti chybějících špičáků, spojených třmenovou konstrukcí anebo stojících samostatně s patricí kuličkového zásuvného spoje.

V případě, že v dolní čelisti jednostranně zbývají ojedinělé pevné zuby, je neobvyklým řešením zavedení implantátu s cílem zlepšit stabilitu a retenci takovéto náhrady v porovnání s kontrolní skupinou, kde je náhrada kotvena jednostranně vlastním zubem. Základní podmínkou je dobrý stav zbývajících zubu/ů, zpravidla špičáku/premoláru, čímž se tento postup zásadně odlišuje od možnosti využití i značně oslabených pilířů ke kotvení tradiční náhrady, bez podpory implantátu. Celkem 5-ti pacientům byl do dolní čelisti zaveden implantát a s časovým odstupem zhotovena hybridní náhrada kotvená na vlastním zubu a implantátu. Kontrolní skupinu tvořilo 5 pacientů s jedním ponechaným zubem, dále 5 pacientů se dvěma zuby a 5 pacientů se dvěma implantáty v dolní čelisti.

Náhrady, zubní pilíře a zejména pak implantáty byly hodnoceny v časovém odstupu 1 až 6 měsíců po odevzdání náhrady. Náhrady kotvené kombinací obou prvků vykazovaly dobrou funkci srovnatelnou při využití 2 kořenů nebo 2 implantátů. Autoři dále diskutují indikace tohoto netradičního spojení zubu a implantátu do zubní náhrady, výhody, omezení a předpokládanou životnost náhrady resp. pilířů při takovémto způsobu ošetření.

STRESEM INDUKOVANÁ EXPRESE GENU ČASNÉ ODPOVĚDI V MOZKU POTKANŮ S ODLIŠNOU SENZITIVITOU KE STRESU

Autorka: Lenka Trněčková

Školitelka: Doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF a VFN a Universitat Autonomas de Barcelona, Španělsko

ÚVOD: Význam studia stresu je v poslední době zesílen výskytem závažného onemocnění „Post-traumatická stresová porucha“, které postihuje některé jedince více než jiné, v závislosti na typu stresového podnětu a predispozici daného jedince. Pozornost se nyní také věnuje stresorové specifitě odpovědí organismu. Studovali jsme proto vliv dvou typů



stresorů na geneticky odlišných kmenech potkanů, které mají odlišnou aktivitu hypothalamo-hypofyzární-nadledvinové (HPA) osy, na expresi genů časné odpovědi, které zahajují adaptační změny po stresu.

METODA: Pokusy byly provedeny na samcích potkanů kmene Sprague-Dawley (S-D) a Lewis (LE), které mají deficitní aktivitu HPA osy. Imobilizační stres (IMO) a tentýž stres s ponořením potkanů do vody (IMO+C) byly aplikovány po dobu 15 a 60 min podle zásad o správném zacházení s laboratorními zvířaty. Byla připravena sonda pro sledování genu časné odpovědi c-fos, a metodou hybridizace in situ jsme na řezech stanovili expresi těchto genů.

VÝSLEDKY: Expresi c-fos jsme stanovili v 5ti oblastech mozku, které hrají kritickou úlohu ve stresových odpovědích. Ve všech oblastech jsme zjistili oproti kontrolám vysoce signifikantní zvýšení exprese c-fos po aplikaci obou stresorů. LE vykazovali podstatně nižší expresi c-fos než S-D, a není rozdíl mezi účinky použitých stresorů. U S-D byly prokázány specifické rozdíly mezi IMO a IMO+C: v prefrontálním kortexu má silnější účinek IMO (převaha psychické složky) než u IMO+C po 60 min expozici. U paraventriculárního jádra (PVN), které je přímo aktivováno stresory s převahou fyzické složky, nejsou rozdíly mezi oběma stresory, ale v parvocelulární oblasti PVN došlo ke zvýšení exprese po 60 min. Nejvýraznější změny jsme pozorovali v laterálním septu, kde IMO+C působil silněji než IMO v intervalu 15 min.

ZÁVĚR: Naše studie ukazují na významné ovlivnění exprese časného genu c-fos po aplikaci imobilizačního stresu, které závisí na aktivitě HPA osy. V laterálním septu, které má velký význam pro fyzickou komponentu stresu jsme našli vyšší expresi po IMO+C než po IMO, což přispívá k poznatkům o stresorově specifických odpovědích.

Podpořeno granty FRVŠ 980/2004, MSM 1111 0000 1 a GAČR 305/03/H148.

ORIGINÁLNÍ PŘÍPRAVA IMUNOAFINITNÍCH NOSIČŮ POMOCÍ AFINITNÍ SORPCE NA IMOBILIZOVANÝCH KOVOVÝCH IONTECH

Autorka: Eva Zatloukalová

Školitelka: Ing. Zdenka Kučerová, CSc., Ústav patologické fyziologie 1. LF

Imunoafinitní chromatografie je moderní technika pro separaci specifických proteinů z komplexní směsi. Pomocí imunoafinitních nosičů lze též imobilizovat proteiny a zvýšit tak jejich stabilitu, nebo je možné pomocí imunoafinitně navázaných enzymů připravit enzymové reaktory.

Při přípravě imunoafinitního nosiče byla využita přirozená afinita protilátek k imobilizovaným kovovým iontům. Tato metoda je výhodná zejména u ptačích imunoglobulinů, které nelze vázat k proteinům A a G a možnosti jejich orientované imobilizace tím byly dosud poněkud omezeny. Při vývoji metody jsme vycházely z faktu, že imunoglobuliny lze separovat pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech (IMAC-Co²⁺). Imobilizované kobaltnaté ionty s orientovaně navázanou protilátkou byly oxidovány pomocí roztoku peroxidu vodíku na ionty kobaltité, čímž se vazba protilátky na kovové ionty stala ireverzibilní. Během oxidace však docházelo k poškození protilátky a jejímu uvolnění z nosiče. Proto byl postup přípravy nosiče modifikován a imunoglobuliny byly navázány až na nosič s oxidovanými kobaltnatými ionty. Zároveň bylo vyloučeno oxidační působení peroxidu vodíku na protilátku, a bylo tak minimalizováno její poškození. Nespecifické interakce proteinů s neoxidovanými kobaltnatými ionty byly omezeny promytím nosiče roztokem EDTA a nespecificky navázané proteiny byly odstraněny roztokem imidazolu a močoviny.

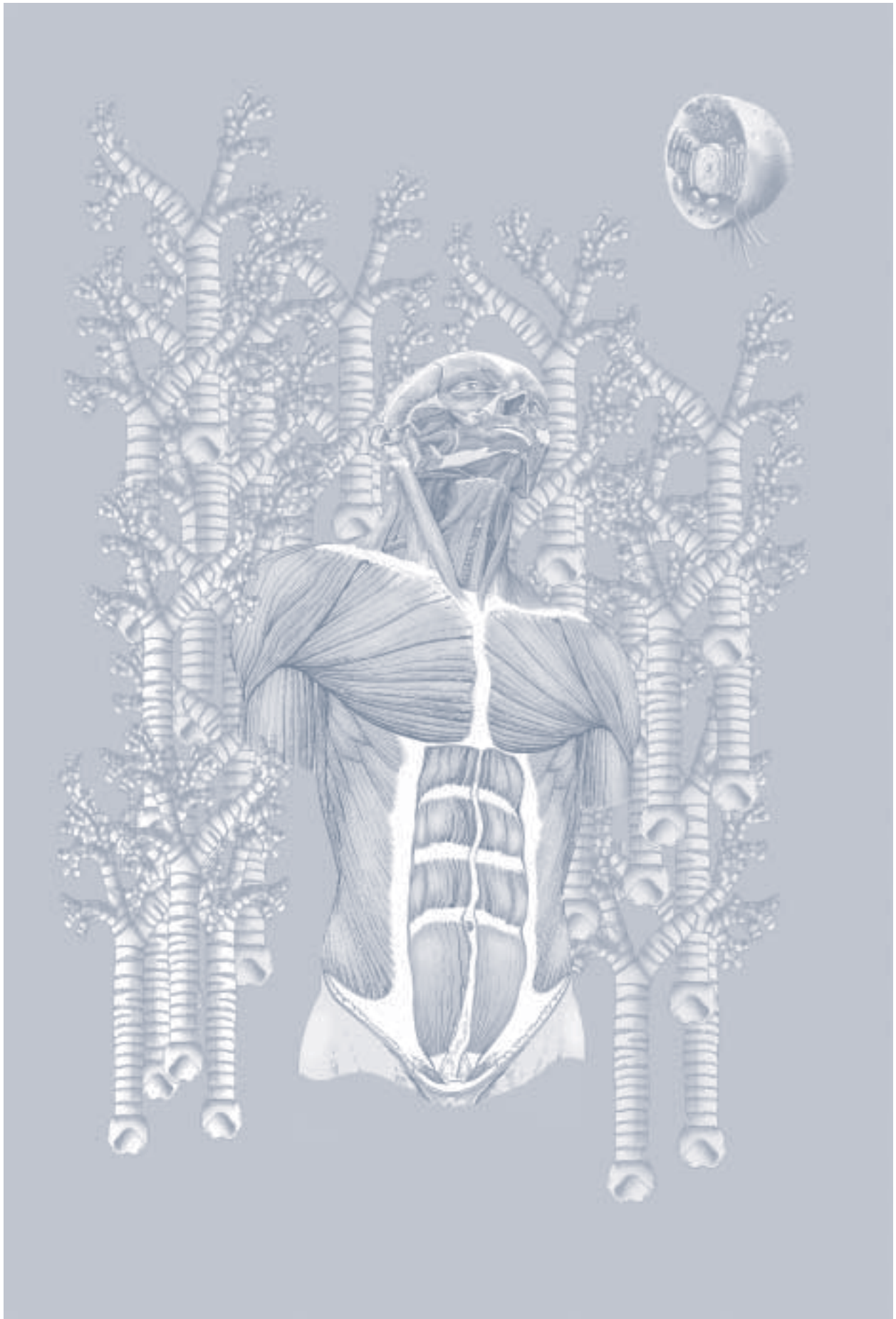
Protilátka navázaná na nosič s oxidovanými kobaltnatými ionty (Co³⁺-IDA-Sepharosa) byla stabilní a zachovala si svoji aktivitu.



Děkan fakulty předává cenu Evě Krasulové, vítězce sekce pregraduální – klinické části.



Na druhém místě v sekci pregraduální – klinické části se umístila Zdeňka Vařiková, studentka 6. ročníku.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST

1. místo : Šedý Jiří, 6.r.

Školitelé: Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc., prof. Jan Kučera, MD, Ph.D.

Název práce: „Vliv neurotrofinů a jejich receptorů na vývoj Paciniho tělísek“

2. místo : Zápotocký Michal, 5.r.

Školitelky: Doc. RNDr. Berta Otová, CSc., Mgr. Júlia Starková

Název práce: „Asociace exprese genu MRP5 se vznikem rezistence k 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-2, 6-diaminopurinu v modelu hematologické malignity“

3. místo : Havránek Ondřej, 3.r.

Školitel: MUDr. Michal Zikán

Název práce: „Analýza mutace 3819del5 genu BRCA1 v české populaci“

1. místo

VLIV NEUROTROPHINŮ A JEJICH RECEPTORŮ
NA VÝVOJ PACINIHO TĚLÍSEK

Autor: Jiří Šedý (6. ročník)

Školitelé: Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc., Anatomický ústav 1. LF UK, Prof. Jan Kučera, MD, PhD, Department of Neurology, Boston University, USA

Klíčová slova: Paciniho tělíska – vývoj – neurotrophiny – Trk receptory - myš



Jiří Šedý

Abstrakt

Paciniho tělíska jsou rychle se adaptující mechanoreceptory, uložené zejména v podkoží, na periostu a v interosseálních membránách. Jejich vývoj je podmíněn komplexními interakcemi axonů senzitivních neuronů a cílových buněk v periférii (Zelená, 1994). V této interakci se uplatňují neurotrophiny, které podmiňují diferenciaci a přežívání senzitivních neuronů. Zatímco pro proprioceptivní a nociceptivní zakončení byly zjištěny neurotrophiny, které jejich vývoj podmiňují, není dosud známo, které neurotrophiny jsou nutné pro vývoj Paciniho tělísk. Objasnit tento vztah je cílem předkládané studie.

Byly použity transgenní myši s vyřazenými geny pro nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT3) a neurotrophin-4 (NT4) a jejich TrkA, TrkB, TrkC a p75^{NTR} receptory. Genotypizace transgenních zvířat byla prováděna pomocí PCR s použitím příslušných primerů. Skupina Paciniho tělísk na bérce u novorozených zvířat byla kvantifikována in situ po imunohistochemickém znázornění průkazem cholinesterázy, nebo na sériových polotenných eponových řezech. Expres neurotrophinů a jejich receptorů v Paciniho těliscích byla prováděna pomocí protilátek v kryostatových řezech.

Delece genu pro jednotlivé růstové faktory, právě tak jako pro jejich jednotlivé Trk receptory vedly ke snížení počtu Paciniho tělísk a jejich inervujících axonů, ale nikdy k jejich úplné absenci. Deficity byly největší u *NT3*^{-/-} mutantní myši, méně u *BDNF*^{-/-} a nejméně u *NT4*^{-/-} myši. Delece *NGF* měla minimální dopad. Mutanty s vyřazenými geny pro neurotrophinové receptory ukázaly, že největší dopad má signalizace prostřednictvím receptorů TrkA a TrkB, méně TrkC a prakticky zanedbatelná je signalizace přes p75^{NTR} receptor. Použili jsme proto vícenásobné myší mutanty, které ukázaly, že vytvoření plného počtu Paciniho tělísk a inervujících neuronů vyžaduje expresi *NT3*, zároveň s expresí *BDNF* nebo *NT4*.

Tyto výsledky ukazují, že pro vývoj Paciniho tělíska a jeho inervujícího neuronu je nejvýznamnější *NT3* v koexpresi s některým z dalších neurotrophinů. Tato signalizace vyžaduje především TrkA a TrkB receptor.

Úvod

Vývoj mechanoreceptorů je podmíněn komplexními interakcemi mezi vrůstajícími nervy senzitivních neuronů spinálních ganglií a buňkami periferie (Zelená, 1994). V této interakci se uplatňují neurotrophiny.

Paciniho tělíska jsou rychle se adaptující mechanoreceptory, složené z centrálního axonu, vnitřního sloupce, zevních lamel a vazivového pouzdra. Jsou uložena v různých částech těla, jako například na periostu, mezikostní membráně, v dermis etc. Centrální axon a vnitřní sloupec Paciniho tělíska vykazuje přítomnost cholinesterázové aktivity.

Neurotrophiny patří do rodiny růstových faktorů, které ovlivňují proliferaci, diferenciaci, přežívání a funkceschopnost aferentních neuronů. Jedná se o nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) a neurotrophin-4 (NT-4). Neurotrophiny se vážou se s vysokou afinitou na tyrozinkinázové receptory TrkA, TrkB a TrkC a na nízkofinitní receptor p75.

NGF se váže predominantně na TrkA, BDNF na TrkB a NT-4 na TrkA a TrkB. U NT-3 je v literatuře popisována vazba na všechny neurotrophinové receptory, zejména však na TrkC (Ernfors et al., 1994).

Zatímco je známo, že např. NT-3 je esenciální faktor pro vývoj svalových vřetének a jejich proprioceptivních neuronů (Ernfors et al., 1994) a NGF pro vývoj nociceptivních neuronů a jejich zakončení (Patel et al., 2000), nebylo dosud jasné, které neurotrophiny podmiňují vývoj mechanosenzitivních neuronů, které inervují Paciniho tělíska.

Naším cílem bylo vytvořit model, který umožní kvantitativní analýzu Paciniho tělísk, a stanovit roli jednotlivých neurotrophinů a jejich receptorů ve vývoji těchto mechanoreceptorů.

Předběžné výsledky této práce byly prezentovány na Studentské vědecké konferenci (Šedý, 2002), tehdy na základě nálezu deficitů v počtu pouze u NT-3 a TrkC mutant.

Materiál a metody

Kmeny myši

V naší studii jsme použili řadu transgenních kmenů myši. Jednalo se o mutanty (-/-), heterozygoty (+/-) a wild type kontroly (+/+). Ke genotypizaci myši jsme používali standartní PCR a Southern blot.

Použity byly kmeny s vyřazenými geny pro jednotlivé neurotrophiny, *NGF*, 129/balb/c (Crowley et al., 1994), *NT3*, 129/balb/c (Ernfors et al., 1994a), *NT3*^{lacZ/lacZ}, 129/c57bl/6 (Fariñas et al., 1996), *BDNF*, 129/balb/c (Ernfors et al., 1994b)

a *NT4*, 129/balb/c (Liu et al., 1995), dále kmeny mutantní pro vysokoafinitní receptory *TrkA*, 129/c57bl/6 (Smeyne et al. 1994), *TrkB*, 129/c57bl/6 (Klein et al., 1993) a *TrkC_E*, 129/c57bl/6 (Tessarollo et al., 1997), *TrkC_K*, 129/c57bl/6 (Klein et al., 1994) a nízkofinitní receptor *p75^{NTR}*, 129/balb/c (Lee et al., 1992).

Rovněž jsme studovali dvojité transgenní *NT3;BDNF*, *NT3;NT4* a *NT4;BDNF* a trojitě transgenní kmen *NT3;BDNF;NT4*.

Perfuze myši

U myši v pentobarbitalové narkóze byl otevřen hrudník a obnaženo srdce. Po odstřížení ouška pravé předsíně bylo injikováno do levé komory nejdříve 5ml fyziologického roztoku, pak následovala kontinuální infuzí 4%PFA, dokud nebyly tkáně dostatečně fixovány.

Počítání Paciniho tělísek in situ

Skupina Paciniho tělísek na bérce u myši byla vypreparována, znázorněna průkazem cholinesterázové aktivity dle Karnovského a Rootse (1964) a tělíška kvantifikována.

Eponové řezy

Tkáně byly perfundovány 4% PFA s glutaraldehydem, zality do eponu, krájeny na sériové polotenské 1 μ m řezy, barveny toluidinovou modří a montovány.

Imunohistochemie

Expres *TrkA*, *TrkB*, *TrkC* a *BDNF* byla studována u embryonálních, novorozených a dospělých myši s použitím imunohistochemie. Perfundované bérce byly prosyceny 7,5 %, 15% and 30% sacharózou, zality do OCT média (Sakura Finetek USA Inc., CA), zamrazeny a bločky byly krájeny na 10 μ m řezy.

Poté byly řezy preinkubovány v normálním kozím séru v PBS v koncentraci 1:10, byla blokována endogenní peroxidáza a nespecifické vazby, následovala inkubace při 4°C s primární protilátkou anti-*TrkA*, anti-*TrkB*, anti-*TrkC* (sc-118, sc-12 and sc-117, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a anti-*BDNF* při ředění 1:50 – 1:300.

Protilátka druhého kroku byla značena peroxidázou (Sigma, St. Louis, MO). Reakční produkt byl vizualizován pomocí 3, 3'-diaminobenzidinu tetrahydrochloridu a H₂O₂. Některé řezy byly dobarveny hematoxylinem.

Statistická analýza

Všechna data byla analyzována s použitím průměru (mean number) a směrodatné odchylky (S.E.M.). Porovnávání dvou skupin bylo prováděno pomocí Studentova T testu na hladině významnosti $p < 0,05$

Výsledky

Nový model pro kvantitativní analýzu Paciniho tělísek

Na bérce u myši existuje specifická konstatní skupina 27-30 Paciniho tělísek, zásobených hlavní větví nervus interosseus posterior, jehož vlákna jsou pro tato zakončení specifická (Zelená et al., 1978). Ve vnitřním sloupci a axonu těchto Paciniho tělísek je možné prokázat cholinesterázovou aktivitu s použitím histochemického znázornění dle Karnovského a Rootse (1964). Po preparaci a znázornění je možné tato Paciniho tělíška kvantifikovat *in situ*.

Druhou možností je krájení bérce na sériové polotenské eponové řezy, umožňující počítání Paciniho tělísek v optickém mikroskopu.

Expres *Trk A*, *TrkB* a *TrkC* receptorů

Paciniho tělíška se utvářejí 17.5 embryonální den, tj. 2 dny před porodem. V této době, stejně jako později u novorozené myši (obr. 1A, 1B), se nám podařilo prokázat expresi *TrkA* a *TrkB* v centrálním axonu. Expres *TrkC* receptoru nastupuje až u novorozené myši a to pouze ve vnitřním sloupci. U dospělé myši (obr. 1C) je již *TrkC* exprimován v axonu, vnitřním sloupci i vazivovém pouzdře.

Rovněž se nám podařilo prokázat koexpresi *TrkA*, *TrkB* v témže axonu u myši stáří 17.5 embryonálního dne a koexpresi *TrkA*, *TrkB* v axonu a *TrkC* ve vnitřním sloupci téhož Paciniho tělíška u novorozené myši.

Expres *NT-3*

Průkaz *NT-3* pomocí protilátky je nesnadný, a proto jsme zvolili metodu průkazu enzymatické aktivity β -galaktozidázy, jejíž gen nahradí u *NT-3^{+/lacZ}* myši gen pro *NT-3*.

NT-3 je u této novorozené myši exprimován ve fibroblastech zevního vazivového pouzdra Paciniho tělíška (obr. 1D).

Role jednotlivých neurotrofinů

Při vyřazení genů pro jednotlivé neurotrofiny (tab. 1) byly největší deficity v počtu Paciniho tělísek pozorovány u *NT-3* nulové mutanty (46 %). U *BDNF^{-/-}* (28% deficit) a u *NT-4^{-/-}* byly deficity menší a konečně u *NGF^{-/-}* se počet Paciniho tělísek snížil pouze o 5%.

Při studiu vícečetných mutant jsme našli úplnou absenci Paciniho tělísek spolu s nervus interosseus u *NT-3^{-/-};BDNF^{-/-}* a u *NT-3^{-/-};NT-4^{-/-}* dvojité transgenních i u trojitě mutantní myši *NT-3^{-/-};BDNF^{-/-};NT-4^{-/-}*.

65% deficit v počtu tělísek byl zaznamenán u *NT-3^{-/-};NT-4^{-/-}* dvojité mutanty.

Role neurotrofinových receptorů

Největší deficity v počtu Paciniho tělísek u myši s vyřazenými geny pro jednotlivé neurotrofinové receptory (tab. 2) jsme našli u *TrkA^{-/-}* (38 %) a *TrkB^{-/-}* (48 %). Role *TrkC*, analyzovaná jednak pro mutantu s vyřazeným celým genem pro *TrkC* (*TrkC_E*), jednak s vyřazením pouze kinázové domény (*TrkC_K*), se ukázala minimální. U *TrkC_E^{-/-}* byl 10% deficit, u *TrkC_K^{-/-}* 12% deficit. Snížení počtu Paciniho tělísek u *p75^{-/-}* (12% deficit) bylo rovněž zanedbatelné.

Nervus interosseus

Z pokusů na kočkách je známo, že Paciniho tělísko není zásobeno více, jak jedním aferentním nervem (Iggo, 1985). Naše pozorování tento vztah potvrzují, a to jak u kontrol, tak u jednotlivých mutant, kde úbytek Paciniho tělísek koresponduje s úbytkem nervových vláken. V krajní situaci, u dvojitých mutant, které nemají žádné Paciniho tělíska (viz výše), je rovněž úplná absence nervus interosseus.

Diskuze

Skupinu Paciniho tělísek na bérce u myši, inervovanou interosseálním nervem, je možno po znázornění průkazem cholinesterázy použít jako kvantitativní model ke studiu vlivu vyřazení jednotlivých neurotrofinů a jejich receptorů.

V Paciniho tělísku jsou od 17.5 embryonálního dne exprimovány TrkA a TrkB, exprese TrkC začíná až u novorozené myši. Ve vnějším vazivovém pouzdře je exprimován NT-3.

Deficit v počtu Paciniho tělísek je nejvýznamnější u myši s vyřazenými geny pro TrkA a TrkB receptory. Pokud jde o myši s vyřazenými geny pro jednotlivé neurotrofiny, nejvyššího deficitu bylo dosaženo u NT3^{-/-}. Defekty v počtu tělísek korespondovaly s defekty v počtu vláken nervus interosseus.

Úplného vymizení Paciniho tělísek bylo dosaženo až tehdy, pokud byly vyřazeny geny pro dva neurotrofiny, tj. NT-3 spolu s BDNF a/nebo NT-4. U těchto mutant jsme rovněž nenalezli interosseální nerv.

Z těchto výsledků je patrné, že nejvýznamnějším neurotrofinem pro vývoj Paciniho tělísek je NT-3. Jakákoli kombinace NT-3 s jiným neurotrofinem je totiž kritická pro jejich vývoj.

Je potvrzeno, že jedno Paciniho tělísko je zásobeno jedním interosseálním nervem, tedy jedním neuronem spinálního ganglia.

Ukázalo se rovněž, že NT-3/TrkA a NT-3/TrkB signalizace je daleko významnější, než NT-3/TrkC signalizace, což je v rozporu s předchozími studiemi pro ostatní mechanoreceptory (Ernfors, et al., 1994; Szeder et al., 2003; Sieber-Blum et al., 2004)

Závěr

Různá závislost vývoje Paciniho tělísek na různých neurotrophinech koresponduje s různou expresí Trk receptorů ve spinálním gangliu (Piñón et al., 1996).

Pokud přijmeme fakt, že fylogeneticky starší mechanoreceptory v kůži jsou závislé na více neurotrophinech (Rice et al., 1998), naproti fylogeneticky mladším, závislým pouze na jednom neurotrofinu (Ernfors, et al., 1994), lze řadit Paciniho tělíska na bérce u myši někam doprostřed.

Poděkování

Za technickou pomoc děkuji laborantkám Anatomického ústavu 1. LF Evě Kluzákové, Markétě Pleschnerové a Aleně Kautské a laborantkám VA Medical Center v Bostonu, Chau Nguyen a Bich Nguyen. Za grantovou podporu VZ 1111 00003-3G a LN 00A065 (MG); National Institutes of Health, NS38500 (MSB); # 1FY00-478 z National Foundation March of Dimes (MSB); Veterans Administration (JK); National Science Foundation, 0077922 (JK).

Literatura

- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, MacMahon SB, Shelton DL, Levinson AD. 1994. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76:1001-1011.
- Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R. 1994. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77:503-512.
- Fariñas I, Yoshida CK, Backus C, Reichardt LF. 1996. Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 17:1065-1078.
- Iggo A. 1985. Sensory receptors in the skin of mammals and their sensory functions. *Rev Neurol* 141:599.
- Karnovsky MJ, Roots LA. 1964. "Direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12:219-221.
- Klein R, Silos-Santiago I, Smeyne RJ, Lira SA, Brambilla R, Bryant S, Zhang L, Snider WD, Barbacid M. 1994. Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature* 368:249-251.
- Liu X, Ernfors P, Wu H, Jaenisch R. 1995. Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 375:319-328.
- Patel TD, Jackman A, Rice FL, Kucera J, Snider WD. 2000. Development of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron* 25: 345-357.
- Piñón LG, Minichiello L, Klein R, Davies AM. 1996. Timing of neuronal death in *trkA*, *trkB* and *trkC* mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signaling. *Development* 122:3255-3261.
- Rice, FL, Albers KM, Davis KM, Silos-Santiago I, Wilkinson A, LeMaster AM, Ernfors P, Smeyne RJ, Aldskogius H, Phillips HS, Barbacid M, DeChiara TM, Yancopoulos GD, Dunne CE, Fundin BT. 1998. Differential dependency of unmyelinated and Adelta epidermal and upper dermal innervation on neurotrophins, TRK receptors, and p75^{NTR}. *Dev Biol* 198:57-81.
- Sieber-Blum M, Szeder V, Grim M. 2004. The role of NT-3 signaling in Merkel Cell development. *Prog Brain Res* 146: 63-72.
- Szeder V, Grim M, Kucera J, Sieber-Blum M. 2003. Neurotrophin-3 signaling in mammalian Merkel cell development. *Dev Dyn* 228:623-629.
- Šedý J. 2002. The role of NT-3/trkC signaling in the development of crural Pacinian

corpuscles in mice. Third student scientific conference of the First Faculty of Medicine, Charles University, Prague. 38-42.
 Tessarollo L, Tsoulfas P, Donovan MJ, Palko ME, Blair-Flynn J, Hepstead BL, Parada LF. 1997. Targeted deletion of all isoforms of the *trkC* gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates *trkC* in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14776-14781.
 Zelená J. 1978. The development of Pacinian corpuscles. *J Neurocytol* 7:71-91.

TABULKA 1. POČTY PACINIHO TĚLÍSEK U MUTANTNÍCH MYŠÍ PRO JEDEN NEBO VÍCE NEUROTROPHINŮ. HODNOTY JSOU PRŮMĚR ± SMĚRODATNÁ ODCHYLKA U JEDNOTLIVÝCH MUTANT VE SROVÁNÍ S KONTROLAMI (WT). PŘÍTOMNOST (+) NABO CHYBĚNÍ (-) N. INTEROSSEUS JE UVEDENA V PARVÉM SLOUPCI. HODNOTY OZNAČENÉ* JSOU SIGNIFIKANTNÍ NA HLADINĚ VÝZNAMNOSTI $P < 0.05$.

Genotyp	Počet Paciniho tělísek	% WT	% Deficit	Nervus interosseus
A. Jednotlivé mutanty				
WT	27.5 ± 0.4; N= 8	100%	—	+
NGF ^{-/-}	26.0 ± 0.7; N= 4	96%	5%	+
NT4 ^{-/-}	23.5 ± 0.5; N= 4*	85%	15%	+
BDNF ^{-/-}	19.7 ± 0.6; N= 9*	72%	28%	+
NT3 ^{-/-} (P0-P1)	14.7 ± 0.5; N= 6*	54%	46%	+
B. Vícečetné mutanty				
BDNF ^{-/-} ;NT4 ^{-/-}	9.5 ± 0.6; N=4*	35%	65%	+
NT3 ^{-/-} ;BDNF ^{-/-}	0±0; N= 3	0%	100%	-
NT3 ^{-/-} ;NT4 ^{-/-}	0±0; N= 3	0%	100%	-
NT3 ^{-/-} ;BDNF ^{-/-} ;NT4 ^{-/-}	0±0; N= 3	0%	100%	-

TABULKA 2. DEFICITY V POČTU PACINIHO TĚLÍSEK U MUTANTNÍ MYŠÍ S VYŘAZENÝMI JEDNOTLIVÝMI RECEPTORY. HODNOTY JSOU PRŮMĚR ± SMĚRODATNÁ ODCHYLKA U JEDNOTLIVÝCH MUTANT VE SROVÁNÍ S KONTROLAMI (WT). HODNOTY OZNAČENÉ* JSOU SIGNIFIKANTNÍ NA HLADINĚ VÝZNAMNOSTI $P < 0.05$.

Genotyp	Počet Paciniho tělísek	% WT	% Deficit
WT	27.5 ± 0.4; N= 8	100%	—
<i>trkA</i> ^{-/-}	17.0 ± 0.6; N= 4*	62%	38%
<i>trkB</i> ^{-/-}	14.3 ± 0.3; N= 7*	52%	48%
<i>trkC_x</i> ^{-/-}	23.0 ± 0.7; N= 8*	90%	10%
<i>trkC_β</i> ^{-/-}	25.5 ± 0.9; N= 8*	88%	12%
<i>p75^{NTR}</i> ^{-/-}	24.3 ± 0.4; N= 7*	88%	12%

2. místo

ASOCIACE EXPRESE GENU MRP5 SE VZNIKEM REZISTENCE K 9-[2-(FOSFONOMETHOXY)ETHYL]-2,6-DIAMINOPURINU V MODELU HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY

Autor: Michal Zápotocký (5. ročník)

Školitelé: Doc. RNDr. Berta Otová, CSc., Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF a VFN, Mgr. Júlia Starková, CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) 2.LF a Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF a VFN



Michal Zápotocký

Úvod

9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurin (PMEDAP) je jeden z acyklických analog nukleotidů, které byly vyvinuty v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Obsahuje fosfonomethyleterovou skupinu vázanou k hydroxylové skupině postranního alifatického řetězce, který simuluje cukerný zbytek vázaný na heterocyklickou bázi. Fosfonátová skupina je metabolicky stabilní a není štěpena buněčnými hydrolázami. Transportuje se membránou mechanismem podobným endocytóze, aniž by podléhal defosforylaci. K dosažení metabolicky aktivního stavu je potřeba dvou fosforylačních kroků (PME-DAPpp). To se děje účinkem AK2 mitochondriální adenylátkinázy a NDP-kinázy, která se nachází v cytosolu. Ve formě difosfátu je jako kompetitivní substrát inhibitor (analog 2-deoxynukleosid-5-trifosfátů) inkorporován do řetězce DNA. PMEDAPpp inhibuje eukaryotní polymerázu d a působí jako terminátor bránící další elongaci vedoucího vlákna při replikaci DNA.

Cytostatický účinek PMEDAP a indukce apoptózy v podmínkách *in vitro* byla statisticky významná pro linii lidské B-buněčné leukemie (Reh) a linii lidské T-buněčné leukemie (CCRF-CEM). Buněčná linie lidského karcinomu děložního čípku (HeLa) nebyla k působení PMEDAP citlivá (1).

Signifikantní cytostatický účinek PMEDAP *in vivo* byl zaznamenán na spontánním T-buněčném lymfomu inbrední linie Sprague Dawley potkanů (SD/Cub). Po podání látky do okolí rostoucího lymfomu došlo k potlačení mitotické aktivity neoplastických buněk a k indukci apoptózy v nádorové tkáni. Potlačení progresu maligního onemocnění vedlo k prodloužení doby přežití léčených zvířat a zpomalení metastazování nádorových buněk do plic, sleziny a lymfatických uzlin (2).

Vliv PMEDAP na průběh buněčného cyklu a jeho schopnost indukovat apoptózu byla testována na lidských leukemických liniích MOLT-4 (lymfoblastická leukemie), HL-60 (promyelocytická leukemie) a ML-1 (myeloblastická leukemie). Pokusy ukázaly, že nízké koncentrace analogů nukleotidů vedou k reverzibilním změnám růstové rychlosti. K buněčné smrti apoptózu dochází až po působení vyšších koncentrací testované látky jako důsledek kumulace ireverzibilních změn v buňkách (3).

Mnohočetná léková rezistence (MDR) je pozorována u mnoha onkologických pacientů léčených chemoterapií. Do dnešní doby bylo v souvislosti s MDR identifikováno 49 ATP vázajících transportérů (ABC – ATP binding cassette) lokalizovaných na buněčné membráně, které vyvolávají tento fenomén vypumpováním různých cytostatických látek z nádorových buněk. Rodina ABC transportních proteinů se skládá z 6 podskupin, kde nejvíce prozkoumané jsou dvě z nich: (i) P-glykoprotein (MDR1), (ii) s mnohočetnou lékovou rezistencí asociované proteiny (MRP). Podrodina MRP je v současnosti zastoupena 13 členy (viz <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>).

Nedávné studie prokázaly, že dva strukturálně podobní členové MRP rodiny, MRP4 a MRP5, jsou asociovány s transportem nukleosidů, a to jak přirozených, tak syntetických (4). Jejich schopnost přenášet přes membránu 3',5'-cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a 3',5'-cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) nasvědčuje, že mohou hrát roli v buněčné signalizaci (5). V současné době byla studována souvislost exprese genů MRP4 a MRP5 s rezistencí vůči 9-(2-fosfonomethoxyethyl)adeninu (PMEA). Bylo prokázáno, že MRP5 transportuje kromě PMEa také monofosfátové deriváty thio-purinů (6), které se používají v protinádorové léčbě leukemií. To je způsobeno afinitou MRP5 nejen k adenosinům, ale také ke guanosinům.

Materiál a metodika

Sloučenina. 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurin (PMEDAP) vyvinutý v Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd (ÚOCHB AV, ČR). (7)

A. *In vivo* experiment.

Zvířata. K experimentu byli použiti dva až tři měsíce staří samci pražské sublinie Sprague-Dawley inbredních potkanů (SD/Cub). Potkani byli chováni za konvenčních podmínek, krmeni komerčním granulovaným krmivem (Bergman TM2-CH) a vodou *ad libitum*. V kontrolní i léčené skupině bylo vždy 6 zvířat sourodého stáří.

Tumor. Spontánní transplantabilní T-buněčný lymfom je dobře geneticky definovaný model hematologické malignity (8). V této studii byl použit lymfom SD 10/96 pasážovaný na syngenních zvířatech. Ve všech experimentech byla inokulována suspenze 10^6 lymfomových buněk v PBS subkutánně do oblasti pravého stehna.

Dávka a protokol podání. PMEDAP byl léčené skupině potkanů aplikován v dávce 5mg/kg jednou denně, s.c., do okolí rostoucího nádoru. Terapie byla zahájena 3 dny po inokulaci lymfomových buněk. Podání PMEDAP pobíhalo v každé pasáži ve třech cyklech (5 dní aplikace PMEDAP, 2 dny pauza, 5 dní aplikace PMEDAP, 2 dny pauza, 4 dny aplikace PMEDAP). 4 hodiny po aplikaci poslední dávky byla provedena autopsie léčených i kontrolních zvířat. Po zvážení tumorů bylo z každého odebráno 10^7 buněk, z nichž se vytvořila směs, ze které se vzala část buněk pro pasáž (opět 10^6 buněk) a část na kvantitativní vyšetření exprese genu MRP5 metodou RQ-RT-PCR (Real-time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Tento protokol byl dodržen u všech čtyř pasáží a tím bylo modelováno dlouhodobé podávání PMEDAP *in vivo*.

B. *In vitro* experiment.

Buňky. Jako *in vitro* model hematologické malignity pro sledování exprese MRP5 genu byla zvolena linie T-buněčné leukemie CCRF-CEM (ATCC CCL 119), která byla kultivována v RPMI médiu obohaceném 10% telecím sérem (FCS).

Dávky a protokol podání. Buňky byly kultivovány v médiu s koncentracemi PMEDAP 0 mmol.l^{-1} a 1 mmol.l^{-1} . Expres genu MRP5 u buněk kultivovaných v médiu za přítomnosti PMEDAP byla srovnávána s expresí u buněk rostoucími bez testované látky. Odběr buněk pro RQ-RT-PCR probíhal v 7 denních intervalech po dobu 5 týdnů. V době odběru byly buňky přeneseny do nového kultivačního media, kontroly bez PMEDAP a testované buňky s PMEDAP. Dále bylo medium měněno také v průběhu týdne a to 72 hodin před odběrem buněk pro analýzu. Výjimkou z tohoto protokolu byl 4. týden kultivace. V důsledku poklesu pH kultivačního media, byla výměna provedena 120 hodin před odběrem buněk pro vyšetření exprese genu MRP5.

C. Kvantifikace genové exprese.

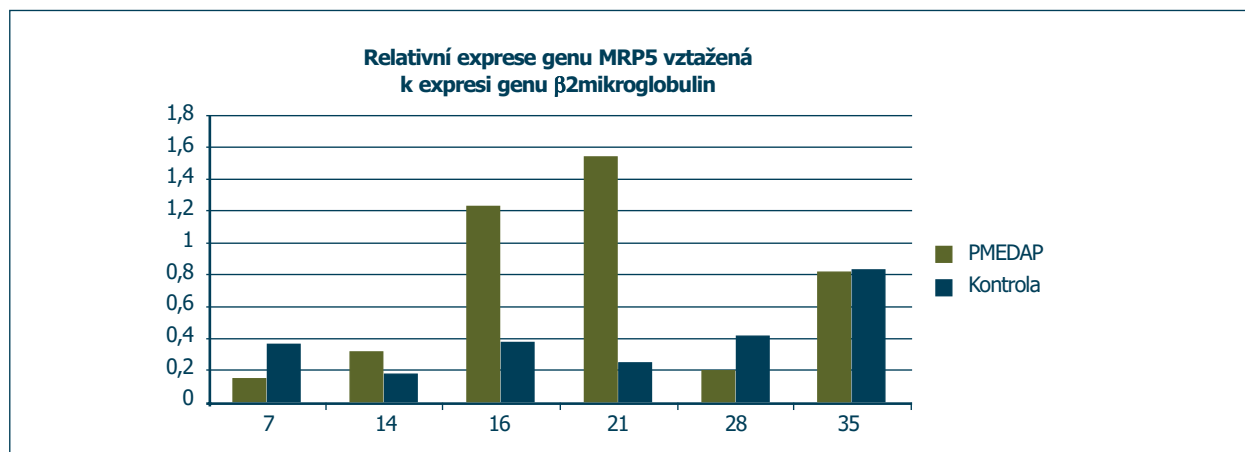
Izolace RNA a reverzní transkripcie (RT). RNA byla izolována z lidských i potkaních buněk získaných v *in vivo* a *in vitro* experimentu modifikovanou metodou dle Chomczynski a Sacchi. Extrahovaná RNA byla přeměněna na cDNA pomocí MoMLV reverzní transkriptázy podle příloženého protokolu od výrobce (Gibco BRL, Carlsbad, TX, USA).

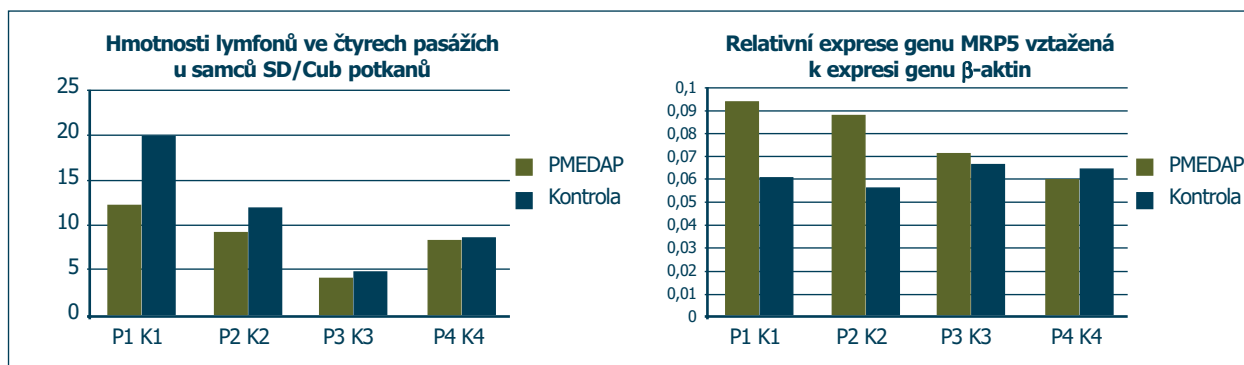
RQ-PCR. Real-time quantification PCR byla provedena v přístroji LightCycler™ (rapid thermal cycler system od firmy Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), který měří fluorescenci v každém cyklu PCR. Pro kvantifikaci exprese genu MRP5 bylo použito fluorescenční barvivo SYBRGreen vázící se na dvouvláknovou DNA (FMC BioProducts, Rockland MA, USA) (9). Pro odstranění chyby dané různým počtem buněk, ze kterých byla RNA izolována, byla stanovena také exprese tzv. housekeeping genů (pro potkaní gen MRP5 to byl β aktin a pro lidský gen MRP5 $\beta 2$ -mikroglobulin). Relativní expresi genu MRP5 udává poměr změřené exprese genu MRP5 a exprese housekeeping genu. Byly navrženy a zakoupeny (TIB MolBio) specifické primery pro lidský i potkaní gen MRP5: 5'CTTTAGAGCATTGCCATTCC 3', 5'GGAGTCAGCCCTTGACAGC 3'. Ke každé reakční směsi o objemu 19 ml, která obsahovala 1 jednotku Platinum Taq DNA polymerázy (Gibco BRL – Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA), byl přidán 1 ml cDNA templátu. Reakce PCR probíhala za těchto podmínek: iniciální denaturace 3 minuty a poté $40 \times 95^\circ\text{C}/5\text{s}$ (denaturace), $62^\circ\text{C}/40\text{s}$ (annealing) a $72^\circ\text{C}/12\text{s}$ (elongace).

Výsledky

***In vitro* experiment.** Relativní hodnoty exprese genu MRP5 u CCRF-CEM buněk rostoucích v přítomnosti látky PMEDAP byly porovnány s kontrolním vzorkem buněk, který byl kultivován bez přítomnosti PMEDAP (viz graf č.1). Po sedmi dnech byla relativní exprese genu MRP5 PMEDAP ovlivněných buněk nižší než u kontrolních. 14. a 21. den byla exprese genu MRP5 signifikantně zvýšena v ovlivněných buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami. Po 28. dni se opět exprese genu MRP5 oproti kontrole snížila (předčasná výměna media). A po 35. dni zůstala exprese genu MRP5 vůči kontrole bez signifikantního rozdílu.

***In vivo* experiment.** Relativní hodnoty exprese genu MRP5 byly porovnány společně s hmotnostmi lymfomů v průběhu 4 pasáží u potkanů, kterým byl aplikován PMEDAP a u kontrolních zvířat (viz graf č.2 a č.3). Přestože byly po 1. pasáži nádory léčených zvířat signifikantně menší než u kontrol, byla statisticky významně zvýšená exprese genu MRP5 oproti kontrole. Po 2. pasáži SD lymfomu byla již citlivost k PMEDAP snížena (viz graf č.2) ale zvýšená exprese genu MRP5 přetrvávala (viz graf č.3). Ve 3. a 4. pasáži již nebyly lymfomy citlivé k PMEDAP a exprese MRP5 byla srovnatelná s lymfomy zvířat, jimž nebyla aplikována tato látka.





(Vysvětlivky ke grafu č.2 a č.3: P1 až P4 léčení potkani v 1. až 4. pasáži, K1 až K4 kontrolní potkani v 1. až 4. pasáži)

Diskuze a závěr.

In vitro experiment. V buněčné linii CCRF-CEM došlo ke zvyšování exprese genu MRP5 u buněk ovlivněných látkou PMEDAP v závislosti na době kultivace. Tento děj je reverzibilní, jak se potvrdilo po čtvrtém týdnu, kdy bylo medium doplněné testovanou látkou vyměněno dříve než v ostatních týdnech.

In vivo experiment. Na heterogenní populaci buněk lymfomů rostoucích na potkanech SD/Cub se ukázalo, že gen MRP5 se zvýšeně exprimuje již od počátku aplikace PMEDAP, ale na začátku terapie neovlivňuje jeho cytostatické účinky. V další fázi aplikace (2. pasáž v tomto protokolu) se snižuje protinádorový účinek PMEDAP, ale zvýšená exprese genu MRP5 přetrvává. Snížení exprese genu MRP5 po 3. a 4. pasáži může být vysvětleno selekcí klonu nádorových buněk, kde za rezistenci k PMEDAP pravděpodobně odpovídá jiný gen či mechanismus.

PMEDAP je perspektivní protinádorová látka, jejíž účinek je závislý na dávce a délce podání. Z výše uvedeného vyplývá, že gen MRP5 hraje roli v rozvoji rezistence vůči této sloučenině, ale bude nutné sledovat vliv dalších genů k přesnějšímu pochopení mechanismu.

Poděkování

Podpořeno grantem MŠMT CEZ J13/98: 111100004.

Rád bych poděkoval všem, kteří mou práci usměrňovali. Zejména pak školitelkám doc. RNDr. Bertě Otové, CSc. a Mgr. Júlii Starkové. Za technickou podporu děkuji laboratořím CLIP v čele s doc. MUDr. Janem Trkou, Ph. D.

Literatura

1. Valeriánová M, Otová B, Bílá V, Hanzalová J, Votruba I, Holý A, Eckschlager T, Krejčí O, Trka J. PMEDAP and its N6-substituted derivatives: genotoxic effect and apoptosis in *in vitro* conditions. *Anticancer Res.* 2003; 23 (6C): 4933-9.
2. Otová B, Zídek Z, Holý A, Votruba I, Sladká M, Marinov I, and Lesková V. Antitumor activity of novel purine acyclic nucleotide analogs PMEA and PMEDAP. *In Vivo* 11: 163-8, 1997
3. Franěk F, Holý A, Votruba I, Eckschlager T. Acyclic nucleotide analogues suppress growth and induce apoptosis in human leukemia cell lines. *Int J Oncol.* 1999 ; 14 (4): 745-52.
4. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, et al. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med.* 1999;5 (9): 1048-1051.
5. Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH, and Schuetz JD Role of MRP4 and MRP5 in Biology and Chemotherapy. *AAPS Pharm Sci.* 2002; 4 (3): article 14.
6. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, et al. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97 (13): 7476-7481.
7. Holý A. Phosphonomethoxyalkyl Analog of Nucleotides. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9, 2567-2592
8. Otová B, Sladká M, Damoiseaux J, Panczak A, Mandys V, Marinov I. Relevant animal model of human lymphoblastic leukaemia/lymphoma—spontaneous T-cell lymphomas in an inbred Sprague-Dawley rat strain (SD/Cub). *Review. Folia Biol (Praha).* 2002; 48 (6): 213-26.
9. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998; 24 (6): 954-8, 960, 962.

3. místo

ANALÝZA MUTACE 3819DEL5 GENU BRCA1 V ČESKÉ POPULACI

Autor: Ondřej Havránek (3. ročník)
Školitel: MUDr. Michal Zikán, Ústav biochemie a experimentální onkologie
 1. LF



Ondřej Havránek

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen v České republice, v 5-10 % případů vzniká na podkladě vrozené mutace. Asi 52 % mutací je přítomno v genu BRCA1, který je tak spolu s genem BRCA2 (32 %) hlavním predispozičním genem. Mutace v tomto genu výrazně zvyšuje riziko karcinomu prsu, více než 80 % do věku 70 let, a karcinomu ovaria, 40-60 % do 70 let (3). Cílem práce je zhodnotit četnost mutace 3819del5 v české populaci s karcinomem prsu vzhledem k diagnostice genetických dispozicí.

Tumor supresorový gen BRCA1 (breast cancer gene 1) je lokalizován na dlouhém raménku 17. chromozomu (17q21), kde zaujímá prostor 81 kpb, mRNA se skládá ze 24 exonů, 22 je kódujících (5592 bp). Proteinový produkt má délku 1863 aminokyselin. Mezi jeho nejdůležitější funkce patří regulace opravy dvouvláknových zlomů DNA, regulace transkripce, regulace buněčného cyklu (zvláště při přechodech G1/S a G2/M) a ubiquitinace (1). Porucha funkce genu BRCA1 vzniká tak, že mutace jedné alely je zděděna od jednoho z rodičů. V průběhu života dojde k inaktivaci druhé alely v somatické buňce (somatická mutace, alelická ztráta). Následná absence funkčního proteinu způsobí genomovou nestabilitu postižené buňky a zvýšení rizika vzniku karcinomu prsu a ovaria.

Četnost hereditárních mutací genu BRCA1 v populaci je asi 1:800 (3), celkově je známo několik set různých mutací (2). Existují populace, ve kterých je četnost některých mutací velmi vysoká, tyto mutace jsou pro ně specifické. Jednou z nich je populace střeoevropských Židů (Aškenáziů), u nichž je některou z mutací genu BRCA1 postiženo kolem 2% jedinců. Nejčastěji se jedná o 5382insC a 185delAG.

Mutace 5382insC a 185delAG jsou časté i v jiných populacích, široké rozšíření mají v Evropě a Severní Americe. V České republice se vyskytují nejčastěji tři mutace: 3819del5, která tvoří 10 % ze všech mutací v genu BRCA1, 300T>G (10 % ze všech mutací v genu BRCA1) a 5382insC (40 % ze všech mutací v genu BRCA1).

Mutace 3819del5 je častá hlavně v Evropě (Německo, Dánsko, Francie, Polsko, Česká republika, Bělorusko, i u českých a polských rodin v USA). Při této mutaci v 11. exonu došlo k delecí pěti nukleotidů (GTAAA), která způsobí posun čtecího rámce s následným ukončením translace a vznikem kratšího afunkčního produktu o délce 1242 aminokyselin. Mutace 3819del5 se stejně jako ostatní hereditární mutace genu BRCA1 přenáší autozomálně dominantně. Porucha funkce genu se projeví již zmíněnou genomovou nestabilitou a vznikem nádoru.

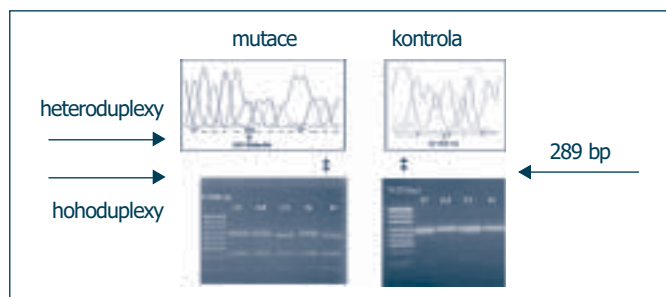
Metodika

Pro studii byl použit neselektovaný soubor pacientek s karcinomem prsu a kontrolní soubor zdravé populace.

Izolace DNA byla provedena z periferní krve pomocí kitu QIAamp DNA Mini Kit (250) od firmy QIAGEN.

Při PCR byl amplifikován úsek o délce 289 bp z exonu 11. Reakční směs o objemu 12,5 ml měla složení: 5 pmol každého primeru, 0,2 mM dNTPs, 1x Pufr (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 při 25 °C, 50 mM KCl, 0,1 % Triton® X-100), 1,5 mM MgCl, 0,5 U DNA polymerázy DyNAzyme II (Finnzymes) a 150 ng DNA. Podmínky reakce: úvodní denaturace 93°C 2 min., 40 cyklů o 93°C 0,5 min., 50°C 0,5 min., 72°C 1 min. a závěrečná elongace 72°C 5 min.

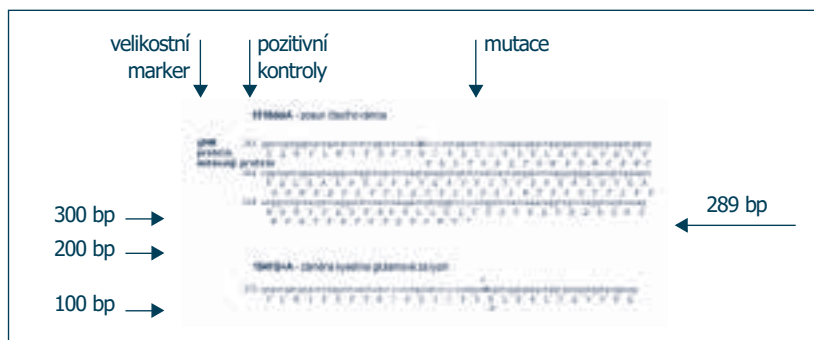
Důležité je, že pokud je přítomna mutace 3819del5 v jedné alele, dochází při polymerázové řetězové reakci ke spontánnímu vzniku heteroduplexů, hybridizuje jedno vlákno DNA bez mutace a jedno vlákno DNA s mutací. V důsledku neúplné komplementarity v místě mutace je změněno prostorové uspořádání dvouvláknové DNA a její mobilita v agarosovém gelu. Mutace byla detekována elektroforézou v 2,5 % agarosovém gelu. Heteroduplexy se v gelu pohybují pomaleji než homoduplexy a na gelu lze tudíž pozorovat dva, při dokonalém rozdělení i tři produkty. Správnost reakce byla zajištěna pozitivními a negativními kontrolami.



OBR. 1: HETERODUPLEXY

Výsledky

V testovaném souboru 500 pacientek s karcinomem prsu byla nalezena jedna mutace, v kontrolním souboru 300 osob nebyla nalezena žádná. Frekvence mutace 3819del5 v populaci žen s karcinomem prsu je tedy přibližně 1:500. Pro přesnější odhad by bylo nutné otestovat mnohem větší soubor pacientů.



OBR. 2: VÝSLEDNÁ ELEKTROFÓRÉZA

Diskuse

Četnost mutací genu BRCA1 v České republice by se dala odhadnout podle studie, kde z 59 nalezených mutací 8 bylo 3819del5 (12). Dědičné dispozice ke vzniku karcinomu prsu má 5-10 % pacientek s nádorem, mutace v genu BRCA1 tvoří 50 % z nich a dle zmíněné brněnské studie je výskyt mutace 3819del5 mezi ostatními v BRCA1 genu 14 %. Z toho by se dalo usuzovat na četnost mutace 3819del5 1:300 v populaci žen s karcinomem prsu.

Četnost výskytu mutace 3819del5 vzhledem ke všem mutacím genu BRCA1 se v různých studiích liší: ve Francii bylo nalezeno 40 mutací, z nich jedenkrát mutace 3819del5 (7), v Polsku 1 ze 17 (11), 1 z 5 (8), 2 ze 34 (10) a 1 ze 14 (5), v USA byly nalezeny 2 mutace u rodin s českým původem (6). Tyto studie byly provedeny ve vybraných rodinách s výskytem karcinomu prsu nebo ovaria splňujících určité podmínky (nízký věk onemocnění, nádor u více příbuzných), z čehož vyplývala vysoká pravděpodobnost zachycení mutace. Poměr mutace 3819del5 k ostatním v Polsku je 1:14, takže zde bychom mohli odhadnout četnost na 1:600 v populaci žen s karcinomem prsu.

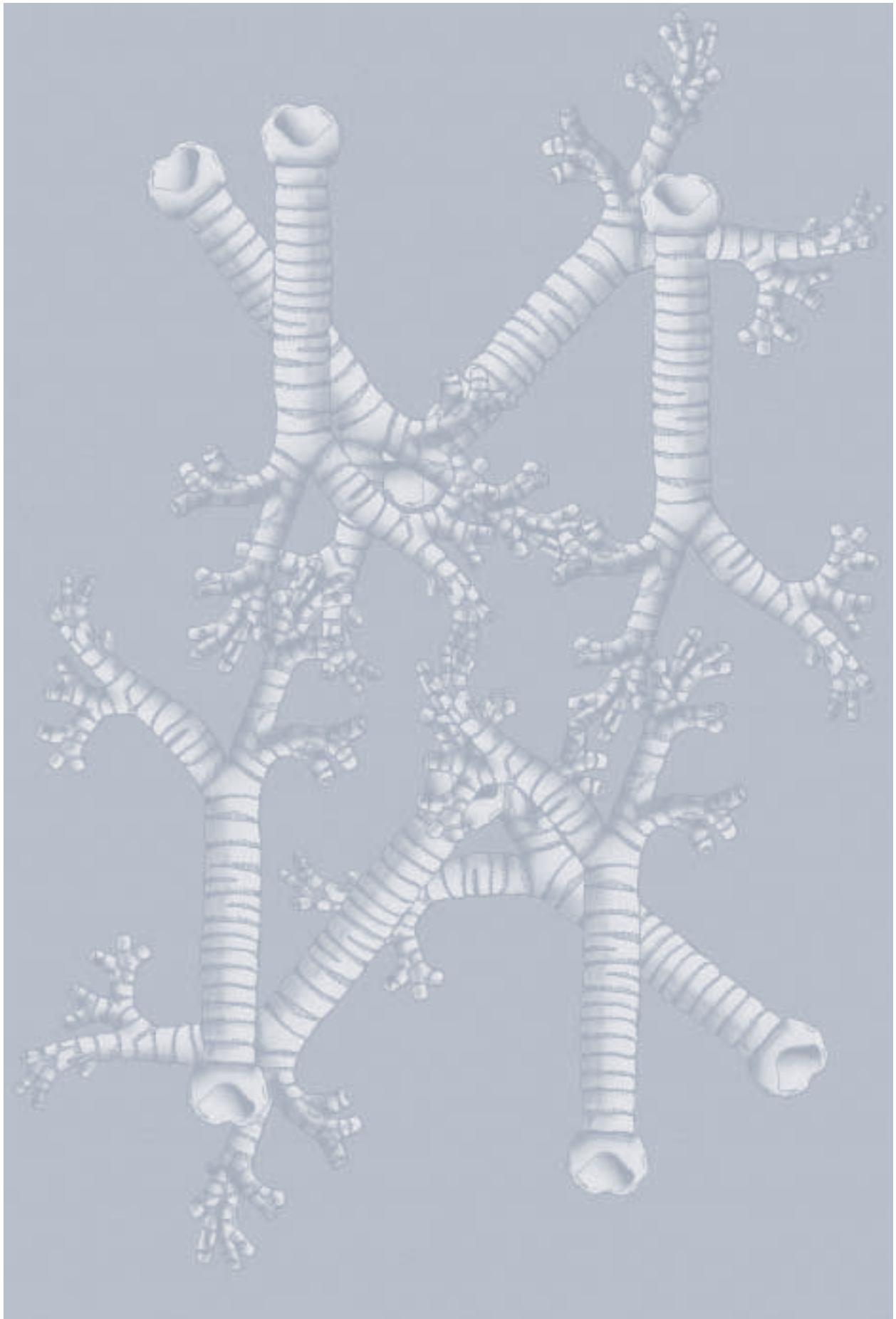
Nález mutace u žen s výskytem karcinomu prsu je důležitý pro diagnostikování mutace u rodinných příslušníků. Prognostický význam nálezu mutace nebyl zatím potvrzen, odlišný přístup k léčbě je možný v provedení chirurgického výkonu a hlavně v pozdějším sledování z důvodu možné recidivy a bilaterálního výskytu nádoru. Nesmí se také zanedbat vyšší riziko vzniku karcinomu ovaria. Nález mutace u zatím zdravého pacienta vede k několika možnostem prevence. Pravděpodobnost vzniku nádoru prsu je kolem 85 % a karcinomu ovaria 40 % (během celého života, zvýšené je i riziko jiných nádorů, např. kolorektální ca., ca. prostaty, to se týká i pacientů s již přítomným nádorem). Pacientka může být sledována a zákrok odložen na dobu vzestupu rizika vzniku nádoru, nebo může být provedena preventivní mastektomie, která velmi podstatně sníží riziko vzniku karcinomu prsu (až k 1 %), a preventivní adnexektomie, která dramaticky sníží riziko karcinomu ovaria (na 3 %). Adnexektomie zároveň zmenší hormonální stimulaci prsní žlázy, a tak i riziko nádoru prsu. Existuje i možnost chemoprevence. Pozitivní vliv má i úprava životosprávy, pacientky by měly snížit konzumaci alkoholu a nekouřit (9).

Zatímco mutační analýza celého genu BRCA1 je velmi technicky a finančně náročná, analýza jedné nebo několika v dané populaci nejčastějších mutací je snadná a velmi levná. Každý rok se vyskytne v České republice kolem 4500 nových případů karcinomu prsu, z nichž přibližně 230 má genetickou dispozici, 115 mutací v genu BRCA a kolem 60 jednu ze tří nejčastějších mutací. Toto poskytuje možnost relativně jednoduše odhalit 60 mutací ročně s velkým významem pro rodinu pacientky.

Literatura

1. Lea M Starita and Jeffrey D Parvin: *The multiple nuclear functions of BRCA1, transcription, ubiquitination and DNA repair. Current Opinion in Cell Biology* 2003, 15:345-350
2. Pohlreich P, Stříbrná J, Kleibl Z, Zikán M, Kalbáčová R, Petruželka L, Konopásek B: *Mutations of the BRCA1 Gene in Hereditary Breast and Ovarian Cancer in the Czech Republic. Medical Principles and Practice* 2003, 12:23-29
3. Zikán M, Jančárková N, Pohlreich P, Matouš B, Kleibl Z, Stříbrná J, Živný J: *Hereditární dispozice ke vzniku karcinomu prsu a ovaria. Časopis lékařů českých* 2004, 1:26-30
4. Machackova E, Damborsky J, Valik D, Foretova L: *Novel Germline BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast and Breast/Ovarian Cancer Families from the Czech Republic. Human Mutation* 2001, 18(6):545
5. Perkowska M, Brozek I, Wysocka B, Haraldsson K, Sandberg T, Johansson U, Sellberg G, Borg A, Limon J: *BRCA1 and BRCA2 Mutation Analysis in Breast-Ovarian Cancer Families From Northeastern Poland. Human Mutation* 2003, 21(5):553-4

6. *Patricia de Los Rios, Jack E, Kuperstein G, Lynch H, Lubinsky J, Narod S A: Founder Mutations of BRCA1 and BRCA2 in North American Families of Polish Origin That Are Affected with Breast Cancer. American Journal of Human Genetics 2001, 68:546*
7. *Perrin-Vidoz L, Sinilnikova O M, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir G M, Mazoyer S: The nonsense mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. Human Molecular Genetics, 2002, 23:2805–2814*
8. *van der Looij M, Wysocka B, Brozek I, Jassem J, Limon J, Olah E: Founder BRCA1 Mutations and Two Novel Germline BRCA2 Mutations in Breast and/or Ovarian Cancer Families from North-Eastern Poland. Human Mutation 2000, 15(5):480-1*
9. *Bartoňková H, Foretová L, Helmichová E, Kalábová R, Kleibl Z, Konopásek B, Krutílková V, Macháčková E, Novotný J, Petráková K, Petruželka L, Plevová P, Pohlreich P, Rob L, Skovajsová M, Veselý J: Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2. Klinická onkologie 2003, 16:28-34*
10. *Goński B, Byrski T, Huzarski T, Jakubowska A, Menkiszak J, Gronwald J, Płuzanowska A, Bebenek M, Fischer-Maliszewska L, Grzybowska E, Narod S A: Founder Mutations in the BRCA1 Gene in Polish Families with Breast-Ovarian Cancer. American Journal of Human Genetics 2000, 66:1963–1968*
11. *Paszko Z, Skasko E, Wisniewska A, Konopka B, Niwinska A, Pienkowski T: Changes in BRCA1 gene in patients with familial breast cancer in the Warsaw region of Poland. Nowotwory 2002, 52:97-103*
12. *Foretova L, Machackova E, Navratilova M, Pavlu H, Hruby M, Lukesova M, Valik D: BRCA1 and BRCA2 Mutations in Women With Familial or Early-onset Breast/Ovarian Cancer in the Czech Republic. Human Mutation 2004, 23(4):397-8*



SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST

1. místo: Krasulová Eva, 6.r.

Školitelka: Doc. MUDr. Eva Havrdová, Ph.D., MUDr. Helena Marečková, CSc.

Název práce: „Intracellular cytokines in progressive multiple sclerosis treated with pulse cyclophosphamide“

2. místo: Vaňková Zdeňka, 6.r.

Školitelky: MUDr. Karin Malíčková, Prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc., RNDr. Ivana Janatková, MUDr. Helena Marečková, CSc.

Název práce: „Diagnostický význam stanovení protilátek proti fosfolipidům“

3. místo: Kučera Filip, 5.r.

Školitelé: Doc. MUDr. Richard Češka, CSc., MUDr. Michal Vráblík, Ph.D.

Název práce: „Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění a polymorfismus apolipoproteinu E v Mongolsku ve srovnání s českou populací“

3. místo: Tuka Vladimír, 5.r.

Školitel: MUDr. Jan Malík, CSc.

Název práce: „Smyková rychlost v přívodně tepně dialyzačního cévního přístupu u diabetiků“

1. místo

INTRACELLULAR CYTOKINES IN PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS TREATED WITH PULSE CYCLOPHOSPHAMIDE

Autors: Eva Krasulová (6. ročník), Ivana Kovářová, Eva Havrdová (MS Centre – Dpt. of Neurology), Helena Marečková (Dpt. of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital)

Tutor: Assoc.Prof. Eva Havrdová, MD, PhD, Dpt. of Neurology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital



Eva Krasulová

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, autoimmune, inflammatory disease of the central nervous system mediated mainly by activated autoaggressive T-cells directed against myelin antigens. MS was formerly considered to be a strictly demyelinating disease but is now recognized to affect both axons and myelin even at an early stage of the disease.

Though in the pathogenesis of MS both inflammation and neurodegeneration are involved, the therapeutic approach remains restricted to immunomodulating and immunosuppressive drugs. One of them - cyclophosphamide (CPA) - is an alkylating agent used in selected cases of progressive or worsening MS. Responsiveness of the patients to pulse therapy of CPA is limited and there are no markers available to detect this responsiveness early during the administration not to expose the patient to the toxic agent for a long time unnecessarily.

Aim of the study

To detect if there is a correlation between the responsiveness to the pulse therapy of CPA and shift in the cytokine production profile or expression of the surface molecules on peripheral blood cells of the immune system.

Subjects

MS patients were chosen from the MS Centre, Department of Neurology, VFN and 1.LF UK. Patients with progressive MS treated with pulse CPA received 800 mg/m² of CPA together with 1 g methylprednisolone i.v. every 4 weeks. Patients received pulse therapy from 4 to 42 months. Blood was drawn into heparinized tubes (Sodium Heparine) 14 and 30 days after the infusion.

40 patients (F/M = 27:13) with an average age 46.9±9.2 yrs, duration of MS 14±6.9 yrs, and an average disability score (Expanded Disability Status Scale, EDSS) of 4.7±1.2 were studied. Patients were divided into 2 groups according to clinical response (7 good responders + 19 stable patients versus 14 non-responders). The control group consisted of healthy controls (n =12, sex and age matched with the patients group).

Methods

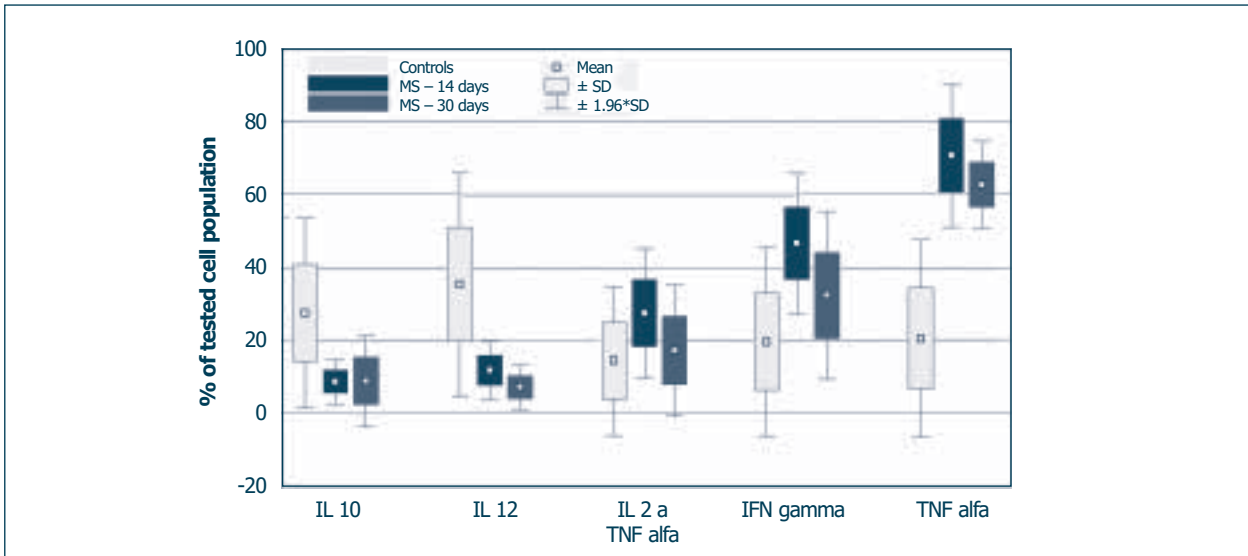
Peripheral blood (PB) was taken 14 and 30 days after 1g MP and 1g CPA administration. PB from 12 age and sex matched healthy controls was used to compare cytokine production. Following proinflammatory cytokines were investigated: Interferon gamma (IFN γ), tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin 12 (IL-12), interleukin 2 (IL-2), antiinflammatory: interleukin 10 (IL-10). Surface molecules investigated were as follow: CD3, CD80, CCR5, CD3HLADR, CD19.

PB cells were stimulated in the incubator (temperature 37 °C + 5% CO₂) 4 hours by mitogen (LPS for monocytes, PMA+ ionomycin for T lymphocytes) in the presence of transport inhibitor protein - Brefeldin A. Cells were fixed and permeabilized and stained by monoclonal antibodies BD Bioscience (anti CD3 PerCP, antiTNF α FITC, anti IL2 PE, anti IFN γ FITC and anti IL4 PE, anti IL10 PE, anti IL12 PE and anti CD14 FITC). For immunophenotyping we chose costimulatory molecule CD 80 PE on B cell (CD 19 PerCP), chemokine receptor CCR5 PE on helper T cells (CD4 PerCP) and activation marker HLA DR PE on T cells (CD3 FITC). Erythrocytes were lysed by lysing solution (BD Bioscience). Samples were washed and analyzed by flow cytometry FACSCalibur (BD) using three colour imaging. T lymphocytes were gated using FSC and CD3 PerCP and the production of TNF α , IL 2 and IFN gamma was measured by the programme Cell Quest. Monocytes were gated using SSC and CD14 FITC and production of IL 10 and IL 12 was measured by the same programme.

Statistical analysis: results are presented as mean \pm SD for each group. Statistical significance was calculated using Student's t-test.

Results*1. Intracellular cytokines in MS patients treated with pulse CPA in comparison with healthy controls.*

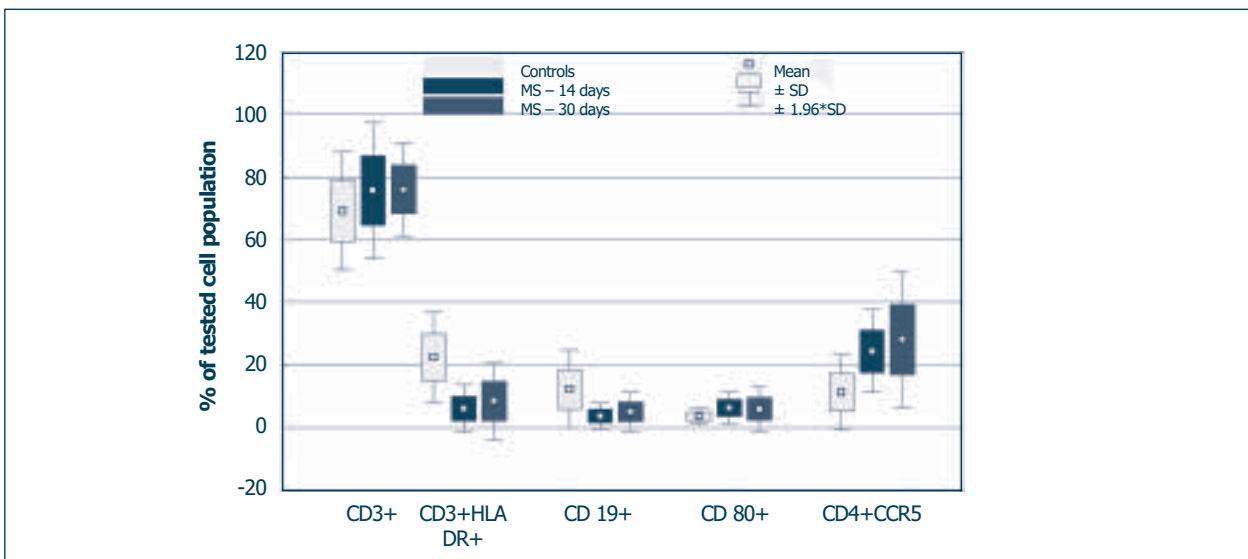
Significant difference was detected in IFN – gamma ($p < 0.000001$), TNF α ($p < 0.00001$), IL –2 ($p < 0.000001$), IL-10 ($p < 0.000001$) and IL-12 ($p < 0.000001$) production between progressive MS patients and healthy controls in the blood drawn 14 days as well as 30 days after infusion (Graph No 1).



GRAPH NO 1: INTRACELULAR CYTOKINES PRODUCED BY THE IMMUNE CELLS FROM MS PATIENTS TREATED WITH CPA IN COMPARISON WITH HEALTHY CONTROLS

2. Surface molecules of the peripheral blood immune cells in MS patients treated with pulse CPA in comparison with healthy controls.

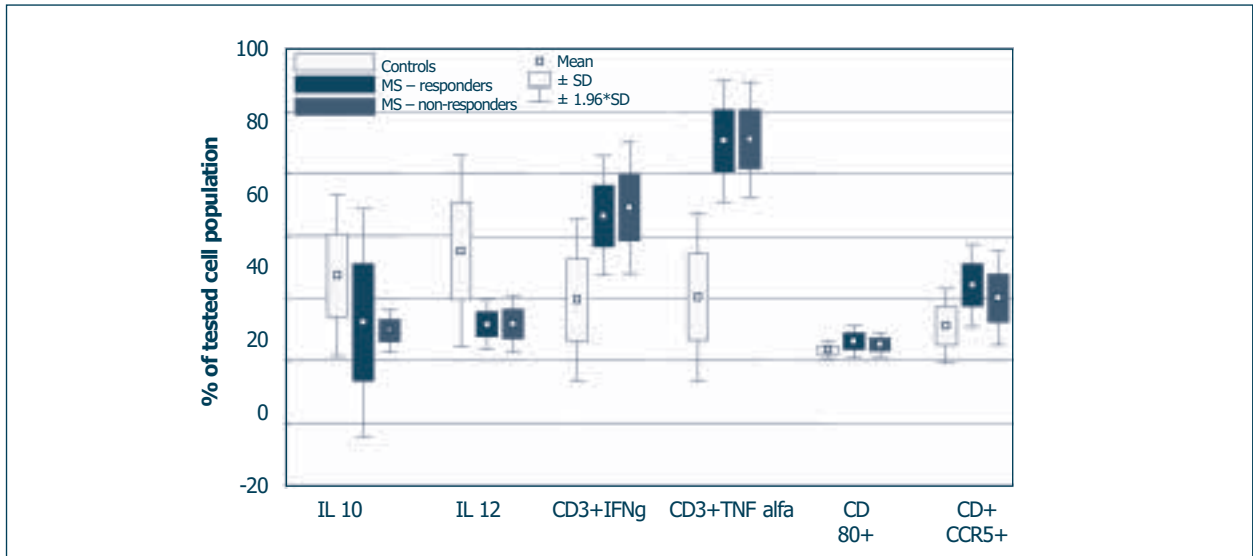
There was significantly higher expression of CD3 ($p=0.04$), CD 80 ($p=0.001$) and CCR5 ($p=0.000001$) in MS patients in comparison with healthy controls. (Graph No 2)



GRAPH NO 2: SURFACE MOLECULES ON IMMUNE CELLS FROM THE MS PATIENTS TREATED WITH CPA

3. Selected intracellular cytokine production and selected surface molecules expressions on the immune cells – responders versus non-responders – blood tests 14 days after the infusion of CPA.

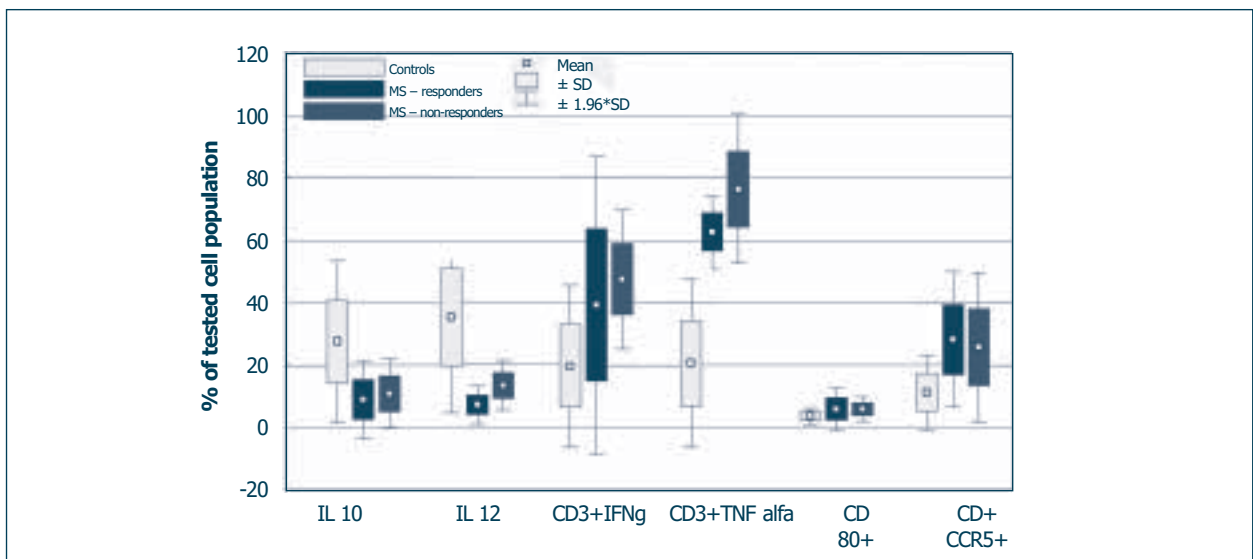
Cytokine production did not differ significantly in treatment responders and non-responders in the blood drawn 14 days after the application of CPA. There was just one significant difference in expression of the chemokine receptor CCR5 on CD4+ cells (higher in responders, $p=0.05$) – Graph No 3.



GRAPH NO 3: SELECTED INTRACELLULAR CYTOKINES AND SURFACE MOLECULES OF THE IMMUNE CELLS - RESPONDERS VERSUS NON-RESPONDERS - 14 DAYS AFTER THE INFUSION

4. Selected intracellular cytokine production and selected surface molecules expressions on the immune cells in responders and non-responders – blood tests 30 days after the infusion of CPA.

30 days after the infusion significant decline in pro-inflammatory cytokine production appeared in responders. Difference between responders and non-responders: IL-12 ($p=0.002$), TNF α ($p=0.007$) and IFN gamma ($p=0.02$) – Graph No 4



GRAPH NO 4: SELECTED INTRACELLULAR CYTOKINES AND SURFACE MOLECULES OF THE IMMUNE CELLS - RESPONDERS AND NON-RESPONDERS - 30 DAYS AFTER THE INFUSION.

Discussion

Large amount of pro-inflammatory cytokines produced by progressive MS patients in comparison with healthy controls suggests that even in the chronic progressive stage of multiple sclerosis (when dominant neurodegenerative component is presumed) and despite aggressive cytostatic treatment immune hyperactivation is still present.

Small number of activated T-cells (CD3+ HLA DR+) and B-cells (CD 19+) in the peripheral blood can be explained by compartmentalization to the central nervous system, where these cells were massively detected in the active MS lesions.

Higher expression of the chemokine receptor CCR5+ in responders in the blood drawn 14 days after infusion could be explained by the presence of the inflammatory component affected by CPA, which has already burnt out in non-responders.

30 days after the infusion of CPA proinflammatory cytokine production was decreased by CPA in responders, but there was no significant decrease in non-responders.

Practical usefulness of presented work

Multiple sclerosis is a disabling disease of young adults affecting at least 10 000 persons in Czech Republic. Though it is incurable till now there are some immunomodulatory and immunosuppressive agents introduced into treatment in last 20-30 years. All of them affect inflammatory component of the disease, most of them unfortunately only partially (interferon beta, steroids, cytostatic drugs). There are no surrogate markers leading the clinician in the therapeutical practice up to now. There is an increasing need to find these markers not to expose the patient the unnecessary risk of prolonged toxic treatment.

We showed that:

1. it is useful and rational to introduce antiinflammatory treatment with pulse cyclophosphamide and methylprednisolone even in advanced stages of MS because the inflammatory activity is still present;
2. responders and non-responders may be detected among these patients both clinically and laboratory.

Our work will continue with early stages of MS and with different types of therapeutical approaches (interferon beta, glatiramer acetate, azathioprine). In case the immune hyperactivation is present in time of diagnosis, there will be an easy test confirming autoimmune origin of clinical symptoms suggestive of MS available.

Complementary pharmacogenomic studies are planned in the future.

2. místo

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI FOSFOLIPIDŮM

Autor: Zdenka Vaňková, 6. ročník
Školitelé: MUDr. Karin Malíčková, Prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc.,
 RNDr. Ivana Janatková, MUDr. Helena Marečková, CSc., Ústav
 imunologie a mikrobiologie 1. LF a VFN Praha (ÚIM)



Zdenka Vaňková

1. Úvod

Antifosfolipidový syndrom (APS) je systémové autoimunitní onemocnění charakterizované klinicky recidivujícími trombózami a/nebo opakovanými spontánními potraty a/nebo trombocytopenií a laboratorně pozitivitou antifosfolipidových protilátek (APLA) a/nebo přítomností lupusového antikoagulans (viz. tab.1) ⁽¹⁾.

TAB. 1: DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU

Klinická kritéria	Laboratorní kritéria
<ul style="list-style-type: none"> • Opakované žilní a/nebo tepenné trombózy • Recidivující spontánní potraty* • Perzistující trombocytopenie 	<ul style="list-style-type: none"> • Pozitivita antifosfolipidových (na kofaktoru dependentních) protilátek • Přítomnost lupusového antikoagulans
Ke stanovení diagnózy APS je nezbytná přítomnost alespoň jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria, pozitivita laboratorních testů musí být prokázána nejméně dvakrát s odstupem 3 měsíců.	

* Jeden nebo více spontánních potratů (? 10. týden gestace) nebo porody mrtvého plodu nebo úmrtí novorozence narozeného předčasně pro fetální distress.

Přes jednoznačná klinická kritéria APS se nemocní s tímto syndromem mohou v klinických projevech zásadním způsobem lišit⁽²⁾. Typickou klinickou manifestací APS je hluboká žilní trombóza dolních končetin, nezářídka se onemocnění projeví plicní embolií. Velmi časté je trombotické poškození mozkových cév, projevující se opakovanými cévními mozkovými příhodami ischemické etiologie nebo tranzitorními ischemickými atakami, okluzí však mohou být poškozeny jakékoliv viscerální nebo periferní cévy. Opakované ztráty plodu ve druhém a třetím trimestru gravidity, stejně však i spontánní potraty v prvním trimestru, jsou projevem APS u žen, které nemusí mít v anamnéze cévní trombózy. Trombocytopenie či autoimunitní hemolytická anémie jsou dalšími možnými klinickými projevy APS.

Vyskytuje-li se tento soubor klinických a laboratorních příznaků u nemocných s jiným autoimunitním onemocněním (nejčastěji se SLE, ale i revmatoidní artritidou, Sjögrenovou nemocí, temporální arteritidou apod.), je APS považován za sekundární. U primárního APS není prokazováno jiné autoimunitní onemocnění⁽³⁾.

Jedním z laboratorních kritérií pro stanovení diagnózy APS je pozitivita antifosfolipidových protilátek. Jedná se o heterogenní skupinu protilátek, které jsou detekovány u pacientů s celou řadou klinických stavů^(4,5) – kromě antifosfolipidového syndromu také u pacientů s autoimunitním onemocněním (SLE, revmatoidní artritida, Sjögrenův syndrom aj.), s infekčními chorobami (syfilis, tuberkulóza, AIDS, infekční mononukleóza, Pneumocystis carinii aj.), s nádorovým onemocněním (maligní lymfomy, myelom, karcinom plic, prostaty aj.) či s léky indukovaným poškozením (chlorpromazin, prokainamid, hydralazin aj.) a dokonce i u určité části zdravých jedinců (3-7%, ve vyšším věku i více)⁽⁵⁾.

O existenci APLA v séru se uvažuje od roku 1906, kdy Wassermann popsal komplement fixační test k detekci reaginů v sérech syfilitických nemocných. Ve čtyřicátých letech minulého století bylo prokázáno, že antigenem vázajícím reagin je kyselý fosfolipid, který lze získat alkoholovou extrakcí z hovězího srdečního svalu – odtud název kardiolipin. V roce 1946 byl do rutinní laboratorní praxe zaveden V.D.R.L. test (Venereal Disease Reference Laboratory), ve kterém je antigenem právě kardiolipin. Při realizaci V.D.R.L. testů se opakovaně objevovaly falešně pozitivní reakce u osob jednoznačně neinfikovaných lues, s negativitou konfirmačních treponemových testů, avšak s výskytem různých autoimunitních onemocnění, nejčastěji SLE. U těchto lidí byla falešná pozitivita V.D.R.L. obvykle trvalým laboratorním nálezem. Druhou skupinu falešných pozitivit tvořili nemocní se závažnými infekčními chorobami, u kterých s vymizením infekce vymizela i pozitivita V.D.R.L. testu.

V roce 1983 použil Harris poprvé kardiolipin v RIA testu, následně byly vyvinuty laboratorně méně náročné ELISA testy. Pokud je na polystyrenovou destičku nanášen kardiolipin, jsou takto zjišťované autoprottilátky označovány jako antikardiolipinové. Tyto protilátky však zkříženě reagují s jinými fosfolipidy – fosfatidylserinem, fosfatidylcholinem, fosfatidylinositolem, fosfatidylethanolaminem a kyselinou fosfatidovou, proto je správnější mluvit o antifosfolipidových protilátkách⁽¹⁾.

Fosfolipidy však nejsou primárním cílem APLA. V roce 1990 tři pracovní skupiny nezávisle na sobě zjistily, že APLA asociované s klinickým průkazem trombóz potřebují k vazbě na fosfolipidy tzv. plazmatický kofaktor, kterým je β -2-glykoprotein-1 (β 2GP1) ⁽¹⁾. Jedná se sérový 50 kDa protein produkovaný zejména v játrech. Je nazýván apolipoprotein H, neboť je součástí chylomikronů, VLDL a HDL. Předpokládá se, že molekula β 2GP1 po vazbě na fosfolipid prodělá

konformační změny, které vedou k odhalení kryptického antigenního neoepitopu. Protilátky proti tomuto epitopu (na kofaktoru dependentní) jsou pak „skutečné“ autoimunitní antifosfolipidové protilátky. Stanovení anti-β2GP1 protilátek tak doplňuje diagnostiku APS a umožňuje lépe rozlišit nebezpečné autoprotiátky a včas odhalit hrozící riziko klinických komplikací⁽¹⁾.

2. Cíl práce

V imunologické laboratoři ÚIM je od roku 2000 vyšetřováno široké spektrum APLA ve třídě IgG a IgM. Cílem této práce bylo zjistit, zda existují rozdíly v titrech a spektru APLA mezi pacienty s primárním či sekundárním APS a lidmi s pozitivními laboratorními nálezy APLA, jejichž klinický obraz pro APS nesvědčí. Dále nás zajímalo, jaký je klinický význam positivity jednotlivých APLA ve třídách IgG a IgM a zda lze z laboratorního nálezu predikovat vznik některé z komplikací APS.

3. Materiál a metodika

Ke stanovení APLA používáme ELISA soupravu firmy Orgentec – BL Diagnostika. Séra jsou na přítomnost protilátek proti fosfolipidům testována nejprve screeningově pomocí diagnostické soupravy Anti-Phospholipid Screen. Jedná se o semi-quantitativní vyšetření ke stanovení protilátek ve třídě IgG a IgM proti směsi fosfolipidů (fosfatidylserin /PS/ + fosfatidylinositol /PI/ + kyselina fosfatidová /PA/ + kardiolipin /CL/ + β-2-glykoprotein-1 /β2GP1/). Pozitivní séra se následně testují soupravou Anti-Phospholipid Profile, což je kvantitativní stanovení IgG a/nebo IgM protilátek proti jednotlivým fosfolipidům (CL, PS, PI, PA a β2GP1).

Celkem bylo v ÚIM v roce 2002 a 2003 provedeno 4195 screeningových vyšetření na přítomnost APLA a 164 typizací. Typizováno bylo celkem 49 pacientů (1,2%) s prokázanou pozitivitou autoprotiátek proti aspoň jednomu fosfolipidu. U těchto 49 pacientů, kteří pocházeli z ambulancí lékařů ÚIM, jsme pak retrospektivně analyzovali lékařskou dokumentaci. Kromě základního onemocnění pacientů nás zajímalo, zda u pacienta je, či někdy v minulosti byl, přítomen některý z možných klinických projevů APS (zejména tepenné či žilní trombózy, poruchy reprodukce u žen nebo trombocytopenie).

Na základě těchto zjištění byli nemocní rozděleni do 4 skupin:

- Skupina 1 – pacienti s primárním APS: 10 žen a 3 muži ve věku od 30 do 73 let, průměrný věk 48,6 let.
- Skupina 2 – pacienti se sekundárním APS: 11 žen a 2 muži ve věku od 29 do 70 let, průměrný věk 46,2 let. Základní diagnózy: 6x SLE, 3x primární vaskulitida, 1x ulcerózní kolitida, 1x pemphigus foliaceus, 1x Sjögrenův syndrom a 1x autoimunitní thyroditida.
- Skupina 3 – pacienti s autoimunitním onemocněním bez příznaků APS: 7 žen a 3 muži ve věku od 17 do 73 let, průměrný věk 46,9 let. Základní diagnózy: 3x sclerosis multiplex, 2x myasthenia gravis, 2x Sjögrenův syndrom, 1x SLE, 1x ulcerózní kolitida, 1x Ormondova nemoc.
- Skupina 4 – pacienti s infekčními a alergickými záněty, bez průkazu autoimunitní choroby: 9 žen a 4 muži ve věku od 27 do 73 let, průměrný věk 44,5 let. Základní diagnózy: 8x opakované záněty horních a dolních dýchacích cest, 3 x atopie, 1x recidivující mykotické vulvovaginitidy, 1x folikulární pyodermie.

Získané údaje o hladinách APLA jsme podrobili statistické analýze. Testovali jsme, zda existuje statisticky významný rozdíl ve skladbě a hladinách APLA mezi pacienty jednotlivých skupin. V další části jsme se soustředili na pacienty s primárním a sekundárním APS. Zajímala nás četnost jednotlivých klinických příznaků v našem souboru pacientů a případná existence statisticky významného rozdílu ve spektru či titru APLA mezi skupinami nemocných vytvořených podle dominantního klinického příznaku. Soubory jsme testovali t-testem s využitím programu Microsoft Excel. Statisticky významný rozdíl mezi soubory byl stanoven při $p < 0,05$.

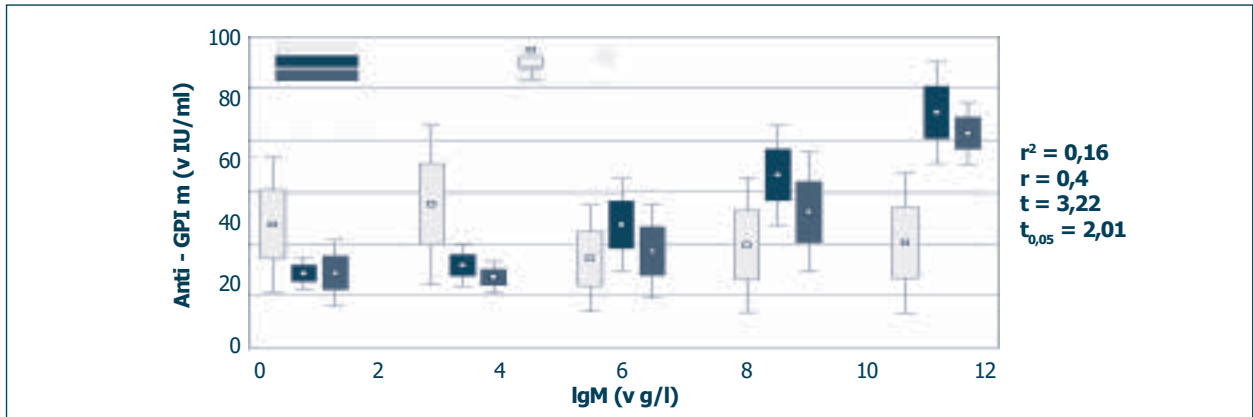
4. Výsledky

TAB. 2: POROVNÁNÍ HODNOT KONCENTRACÍ JEDNOTLIVÝCH APLA MEZI SKUPINAMI PACIENTŮ S RŮZNÝM ZÁKLADNÍM ONEMOCNĚNÍM.

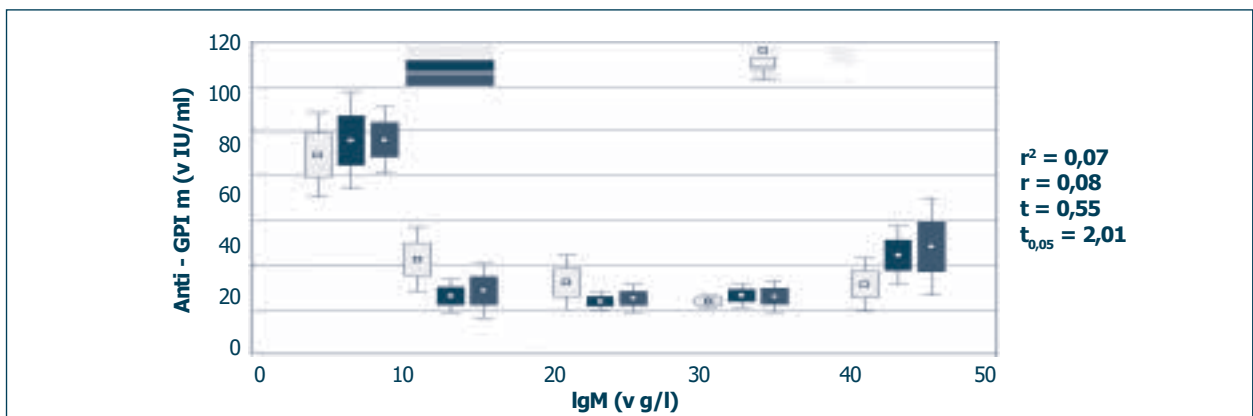
p value	Jednotlivé antifosfolipidové protilátky ve třídě IgG (g) a IgM (m)									
	GPI g	GPI m	ACL g	ACL m	PS g	PI g	PA g	PS m	PI m	PA m
1 vs. 2	0,358	0,163	0,132	0,106	0,349	0,264	0,463	0,110	0,159	0,150
1 vs. 3	0,427	0,186	0,148	0,108	0,340	0,293	0,308	0,176	0,166	0,211
1 vs. 4	0,448	0,020	0,208	0,026	0,343	0,355	0,420	0,007	0,007	0,027
2 vs. 3	0,467	0,409	0,440	0,341	0,296	0,171	0,319	0,492	0,386	0,467
2 vs. 4	0,360	0,033	0,453	0,118	0,276	0,260	0,406	0,009	0,004	0,032
3 vs. 4	0,413	0,208	0,499	0,396	0,477	0,500	0,434	0,075	0,095	0,102

Legenda: **1** – pacienti s primárním APS, **2** – pacienti se sekundárním APS, **3** - pacienti s autoimunitním onemocněním bez příznaků APS, **4** - pacienti s infekčními a alergickými záněty bez projevů autoimunitního onemocnění.

GPI – protilátky proti β-2-glykoproteinu-1, **ACL** – protilátky proti kardiolipinu, **PS** – protilátky proti fosfatidylserinu, **PA** – protilátky proti kys. fosfatidové, **PI** – protilátky proti fosfatidylinositolu



GRAF 1: ZÁVISLOST KONCENTRACE PROTILÁTEK PROTI β -2-GLYKOPROTEINU-1 VE TŘÍDĚ IGM NA CELKOVÉ KONCENTRACI IGM.

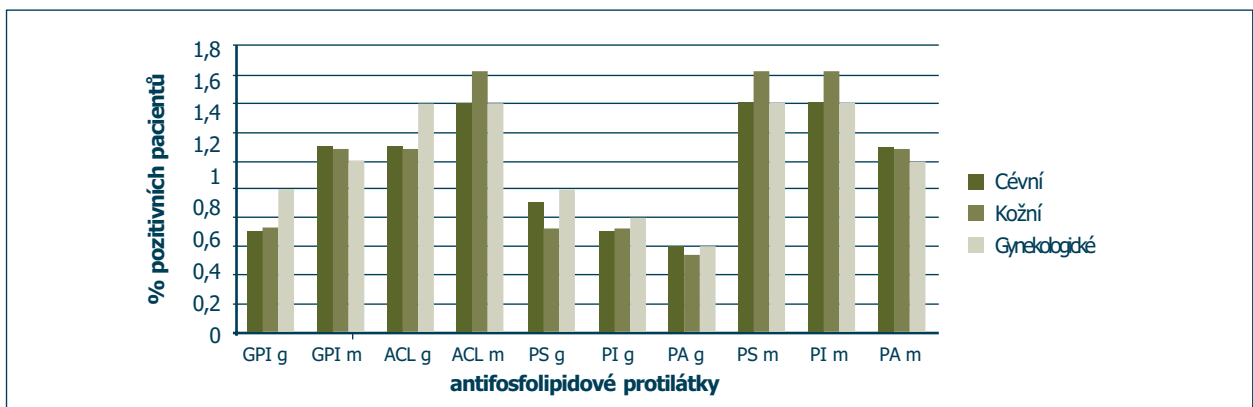


GRAF 2: ZÁVISLOST KONCENTRACE PROTILÁTEK PROTI β -2-GLYKOPROTEINU-1 VE TŘÍDĚ IGG NA CELKOVÉ KONCENTRACI IGG.

TAB. 3: POROVNÁNÍ HODNOT KONCENTRACÍ JEDNOTLIVÝCH APLA MEZI SKUPINAMI PACIENTŮ S RŮZNÝMI KLINICKÝMI PŘÍZNAKY APS.

p value	Jednotlivé antifosfolipidové protilátky ve třídě IgG (g) a IgM (m)									
	GPI g	GPI m	ACL g	ACL m	PS g	PI g	PA g	PS m	PI m	PA m
A vs. B	0,393	0,335	0,296	0,339	0,289	0,461	0,413	0,366	0,341	0,387
A vs. C	0,357	0,421	0,456	0,312	0,383	0,499	0,486	0,355	0,474	0,352
B vs. C	0,280	0,384	0,287	0,197	0,408	0,466	0,448	0,253	0,313	0,292

Legenda: **A** – pacienti s cévními trombózami (n = 20), **B** – pacientky s poruchami reprodukce (n = 10), **C** – pacienti s kožními příznaky (n = 11).



GRAF 3: PODÍL PACIENTŮ S POZITIVITOU DANÉ AUTOPROTILÁTKY ZE VŠECH PACIENTŮ S JEDNOTLIVÝMI PŘÍZNAKY.

TAB. 4: SROVNÁNÍ ČETNOSTI ZASTOUPENÍ JEDNOTLIVÝCH KLINICKÝCH PROJEVŮ APS V NAŠEM SOUBORU S EVROPSKOU EPIDEMIOLOGICKOU STUDIÍ⁽⁶⁾.

Příznak	Podíl pacientů s manifestací příznaku v našem souboru (v %, n = 26)	Podíl pacientů s manifestací příznaku ve studii Euro Phospholipid Project ⁽⁶⁾ (v %, n = 1000)
hluboká žilní trombóza	42,3	39
Povrchová tromboflebitida	34,6	12
Plicní příznaky	11,5	14
CMP	11,5	20
TIA	15,4	11
Migréna	30,8	20
Porucha paměti	3,8	1
Trombocytopenie	0,0	30
Amauróza	0,0	5
spont.potrat v I.trim.	38,1	35
spont.potrat v II.trim.	14,3	17
IUGR	4,8	6
Sterilita	4,8	9
AIM	7,7	6
Angina pectoris	7,7	3
Livedo reticularis	11,5	24
Digitální gangrény	15,4	3
Kožní ulcerace	26,9	6
jiné kožní příznaky	11,5	3

5. Diskuze

APS je onemocnění vzácné. Dosud provedené epidemiologické studie neuvádějí přesná čísla, týkající se incidence a prevalence APS. Prevalence primárního APS se odhaduje na 1-5/100 000 obyvatel a výskyt sekundárního APS asi na 50 % všech nemocných se SLE (ostatní autoimunity jsou provázeny APS vzácněji). Z toho vychází velmi přibližný odhad asi 1000-1500 lidí v České republice, kteří by mohli splňovat diagnostická kritéria APS. Jedná se však pouze o odhady, nepodložené konkrétními epidemiologickými průzkumy. 26 pacientů s diagnózou antifosfolipidového syndromu, ať už primárního nebo sekundárního, přesto není mnoho, zejména ne pro statistické účely, čehož jsme si vědomi. Je třeba zdůraznit, že náš soubor pacientů vychází z dvouletého sledování pozitivních výsledků v laboratoři ÚIM, kdy z 4195 provedených screeningových vyšetření bylo zachyceno „pouze“ 49 pacientů s pozitivními APLA (1,2%).

V první části jsme se zaměřili na sledování rozdílu v hladinách či spektru APLA mezi jednotlivými skupinami našich pacientů. Ve třídě IgM jsme u všech sledovaných protilátek našli ve skupině pacientů s primárním APS statisticky významně vyšší hladiny ($p < 0,05$) než u pacientů s infekčními a alergickými záněty (bez projevů autoimunitního onemocnění) (viz. tab. 2). Rovněž u skupiny pacientů se sekundárním APS jsme našli statisticky významně vyšší hladiny všech APLA než u pacientů s infekčními a alergickými záněty, s výjimkou protilátek proti kardiolipinu, kde jsme nenalezli statisticky významný rozdíl. Toto zjištění odpovídá v literatuře popsané malé specifitě vyšetření protilátek proti kardiolipinu^(2,3,4) a domníváme se proto, že pouhé vyšetření protilátek proti kardiolipinu není dostačující.

Zdá se tedy, že ve třídě IgM má pro diagnózu APS význam nejen pozitivita APLA, ale i výše titru APLA, zatímco ve třídě IgG je důležitější samotná pozitivita APLA a výše titru již nehraje takovou roli.

Mezi ostatními skupinami pacientů jsme ve třídě IgM žádný statisticky významný rozdíl nezaznamenali, ve třídě IgG nebyl statisticky významný rozdíl zaznamenán vůbec (viz. tab. 2). Po těchto (možná trochu překvapivých) zjištěních se nabízela otázka, zda neexistuje závislost koncentrace APLA v izotypu IgM na celkové koncentraci IgM. Skutečně jsme statistickými metodami tuto závislost prokázali (viz. graf 1 – korelační koeficient $r = 0,04$, test významnosti korelačního koeficientu $t > t_{\alpha}$, na příkladu protilátek proti β -2-glykoproteinu-1, podobný výsledek však platil i pro ostatní APLA ve třídě IgM). Pro APLA ve třídě IgG jsme obdobnou závislost neprokázali (viz. graf 2, opět na příkladu protilátek proti β -2-glykoproteinu-1 a s obdobným výsledkem pro všechny APLA ve třídě IgG).

V druhé části jsme se zaměřili na pacienty s klinickými projevy APS (tedy skupinu 1 a 2). Jednalo se o 26 pacientů (21 žen a 5 mužů), které jsme rozdělili dle dominantního klinického příznaku na: A) pacienty s cévními příznaky ($n = 20$, tj. 77%), B) pacientky s poruchami reprodukce ($n = 10$, tj. 48% z celkového počtu žen) a C) pacienty s kožními příznaky ($n = 11$, tj. 42%). Opět nás zajímalo, zda mezi takto vytvořenými skupinami pacientů neexistuje statisticky významný rozdíl – ten jsme však nezaznamenali (viz. tab. 3), jak je patrné i z grafu 3. Nedá se tedy říci, že by pozitivita jedné konkrétní autoprotilátky v laboratorním nálezu predikovala některou z možných komplikací APS.

Na závěr uvádíme srovnání četnosti zastoupení jednotlivých klinických příznaků v našem souboru s evropskou epidemiologickou studií Euro Phospholipid Project, provedenou na tisícovce pacientech v průběhu 10 let na 20 evropských univerzitních centrech (viz. tab.4). Je zřejmé, že přestože je v našem souboru pouze 26 nemocných, četnost zastoupení jednotlivých příznaků je obdobná jako v evropské studii, a tedy že náš soubor je poměrně reprezentativní.



6. Závěr

Na základě našich zjištění se domníváme, že :

1. Pro stanovení diagnózy APS je třeba vyšetřit celé spektrum APLA ve třídě IgG i IgM a zejména v izotypu IgM je důležitá také výše titru APLA.
2. Z laboratorního nálezu pravděpodobně nelze předvídat klinický obraz pacienta a spíše než pozitivita jedné APLA má klinický význam nález positivity dvou a více APLA v libovolné kombinaci.

Seznam použité literatury:

1. *Maličková, K., Fučíková, T., Janatková, I.:* Antifosfolipidový syndrom. *Alergie 2001; 4:1-5.*
2. *Hughes, G.R.V.:* The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet 1999; Vol. 342 (8867), 341-344.*
3. *Greaves, M.:* Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lancet 1999; Vol. 353 (9161), 1348-1353.*
4. *Celli, C.M., Gharavi, A.E.:* Origin and pathogenesis of antiphospholipid antibodies. *Braz J Med Biol Res, June 1998, Vol. 31 (6): 723-732*
5. *Bulíková, A., Matýšková, M.:* Antifosfolipidové protilátky – význam, indikace k vyšetření. *Praktický lékař 75, 1995, 7-8: 339-341.*
6. *Euro-Phospholipid Project Group:* Antiphospholipid Syndrome – Clinical and Immunological Manifestations and Patterns of Disease Expression in a Cohort of 1,000 Patients. *Arthritis and Rheumatism 2002, 46, 4:1019-1027.*

3. místo

RIZIKOVÉ FAKTORY KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ A POLYMORFISMUS APOLIPOPROTEINU E V MONGOLSKU VE SROVNÁNÍ S ČESKOU POPULACÍ

Autoři: Filip Kučera (5. ročník), Bor Amartuvshin, Ts. Altannavch,
Školitelé: Doc. MUDr. Richard Češka, CSc., MUDr. Michal Vrablík, Ph.D.,
 III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1.LF a VFN



Filip Kučera

ABSTRAKT

Problematika kardiovaskulární úmrtnosti se v rozvojových zemích, jako je např. Mongolsko, dostává do popředí vzhledem k výraznému zvýšení úmrtnosti na nemoci oběhového systému, na úkor mortality na infekční choroby. Naše pilotní studie si dala za cíl stavět výskyt běžných rizikových faktorů kardiovaskulárních nemocí u mongolské populace, současně s určením polymorfismu apolipoproteinu E. Soubor jedinců sestával ze skupiny 621 osob z města (275 mužů, 346 žen) a 123 osob z vesnice (60 mužů, 63 žen). U všech probandů byla změřena výška, hmotnost, obvod pasu, na jejichž základě se stanovil BMI, byl vyšetřen krevní tlak, každý vyplnil dotazník zaměřený na rodinnou, osobní a lékovou anamnézu. Na základě těchto údajů byl určen výskyt rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Polymorfismus apolipoproteinu E byl určen pomocí analýzy technikou RFLP. Vyšetřením zjištěná prevalence arteriální hypertenze, obezity a anamnestickými dotazníky odhadovaná prevalence diabetu, infarktu myokardu, mozkové mrtvice a pozitivní rodinné anamnézy kardiovaskulárních onemocnění u městské a vesnické populace je nižší než u české populace. V obou skupinách je bez sledovaných rizikových faktorů přibližně jedna třetina mužů a jedna polovina žen. Distribuce alel apolipoproteinu E v mongolské populaci je $\epsilon 3 = 79,9\%$, $\epsilon 4 = 16,6\%$, $\epsilon 2 = 3,5\%$ (doposud vyšetřeno $n=286$), srovnání s okolními populacemi vzhledem k nedostatku publikací o apolipoproteinu E není možné.

ÚVOD

Ve vyspělých státech světa umírá na kardiovaskulární choroby největší část obyvatelstva. V rozvojových zemích, jako je např. Mongolsko, v současnosti dochází k výraznému zvýšení úmrtnosti na nemoci oběhového systému, na úkor mortality na infekční choroby. Je známo, že ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se podílejí faktory zevního prostředí, i faktory genetické. Mezi nejdůležitější faktory vzniku a rozvoje aterosklerózy patří poruchy metabolismu plazmatických lipidů a lipoproteinů (hyperlipoproteinémie, dyslipoproteinémie) způsobené genetickými odchylkami. A právě geny kódující apolipoproteiny, vystupující v procesu transportu a metabolismu cholesterolu, patří k nejdůležitějším.

Kardiovaskulární riziko u mongolské populace je zatím popsáno jen velmi malým počtem publikací. Naše pilotní studie si dala za cíl stavět výskyt běžných rizikových faktorů kardiovaskulárních nemocí u mongolské populace. Současně byl určen polymorfismus apolipoproteinu E (apoE).

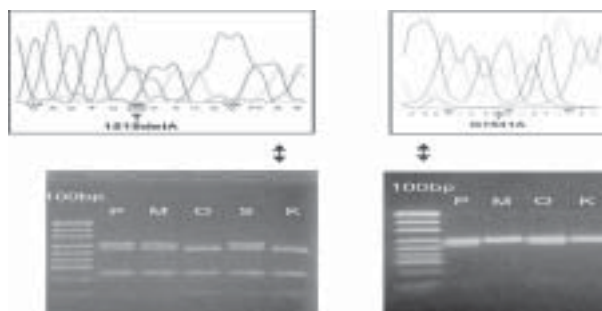
ApoE je jedním z genů, jehož polymorfismus ovlivňuje metabolismus lipoproteinů bohatých na triacylglyceridy. Zprostředkovává vazbu lipoproteinů na LDL receptor (apoB/E) a receptor pro chylomikronové remnanty (LRP). Genový lokus pro apoE se nachází se na krátkém raménku 19. chromozomu. Je polymorfní a kóduje 3 hlavní isoformy apo E2, apo E3, apo E4. Bylo zjištěno, že v porovnání s nejběžnější isoformou apo E3 má apo E2 znatelný cholesterol snižující, zatímco apo E4 naopak cholesterol zvyšující efekt (1), hraje významnou roli v procesu aterogeneze (2). U E2 homozygotních jedinců je kauzální příčinou vzniku hyperlipoproteinémie typu III (familiární dysbetalipoproteinémie) (3). Vedle úlohy apoE v metabolismu lipidů se v posledních letech dostává do popředí i jeho vztah k rozvoji Alzheimerovy demence (4), tvorbě cholesterolových konkrémentů a jiných patologií.

SOUBOR VYŠETŘENÝCH A METODIKA

Sledovanou mongolskou populaci tvořily dvě skupiny. První skupinu tvořilo 621 osob (275 mužů, 346 žen) ve věku 15-84 let ($37,6 \pm 14,3$ let) žijících ve velkých městech (Ulaan-Baatar, Erdenet a Darchan), Druhá skupina sestávala ze 123 osob z vesnice (60 mužů, 63 žen) ve věku 14-78 let ($39,5 \pm 14,5$ let). (Obr. 1)

V obou uvedených skupinách nebyl výběr omezen žádným selekčním kritériem. Údaje a vzorky byly získány od zdravých i hospitalizovaných jedinců.

U všech probandů byla změřena výška, hmotnost, obvod pasu, na jejichž základě se stanovil BMI, byl vyšetřen krevní tlak. Součástí studie byl i dotazník zaměřený na rodinnou, osobní a lékovou anamnézu. Tělesná výška byla



OBR. 1: MÍSTA ODBĚRU VZORKŮ V MONGOLSKU: PLNÝ KRUH = MĚSTSKÁ POPULACE, OBTÁŽENÉ OBLASTI = VESNICKÁ POPULACE

měřena pomocí pásové míry s přesností 1 cm. Hmotnost byla stanovena osobní váhou, odečtené hodnoty se zaokrouhlovaly na nejbližších 500g. Obvod pasu byl měřen u probandů bez svrchního oděvu pásovou mírou s přesností 1 cm, vodorovně ve středu vzdálenosti mezi spodním okrajem žeber a hřbetem kosti kyčelní. Krevní tlak byl měřen po pěti minutovém uklidnění vsedě na pravé paži. Pro měření tlaku byl použit sfyngomanometr a hodnoty se odečítaly s přesností 2 mm.

Nakonec byla každému probandovi odebrána z prstu kapka kapilární krve pro izolaci DNA s použitím izolačního kitu Whatman Bio Science ®. Po extrakci DNA z testačního proužku byla provedena PCR reakce v genu pro apo E. PCR produkt byl následně štěpen restriční endonukleázou Cfo I. Restriční fragmenty se rozdělily vertikální elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu, na kterém se určil polymorfismus apo E.

Definice rizikových faktorů:

- arteriální hypertenze (HP): systolický TK ≥ 140 , nebo diastolický TK ≥ 90 , nebo medikamentózní léčba hypertenze v anamnéze, kouření: současné pravidelné kouření alespoň 1 cigarety denně, obezita: BMI ≥ 30 , abdominální obezita: obvod pasu ≥ 102 cm pro muže, ≥ 88 cm pro ženy, riziková anamnéza kardiovaskulárních onemocnění: výskyt kardiovaskulárního onemocnění u nejbližších příbuzných ve věku do 65 let.

VÝSLEDKY

Na základě objektivního vyšetření byly získány údaje o výskytu některých rizikových faktorů chronických neinfekčních onemocnění ve sledovaných skupinách.

• MĚSTO:

Graf 1 ukazuje výskyt rizikových faktorů kardiovaskulárních nemocí u městské populace. Největší rozdíl mezi muži a ženami byl zjištěn u kuřáctví, kde je 7,6x významnější prevalence u mužské populace. Bez sledovaných rizikových faktorů byla přibližně jedna třetina mužů a jedna polovina žen.

Dotazníky zjištěné užívání léků u sledované městské populace ukazují tabulka 1 a graf 2. Nejvíce se ve městě užívají nesteroidní antiflogistika. Lékem první volby arteriální hypertenze v našem souboru je reserpin. Léčba blokátory kalciových kanálů (především nifedipin), beta blokátory, ACE inhibitory a diuretika se omezuje pouze na méně než 6% městské populace.

• VESNICE:

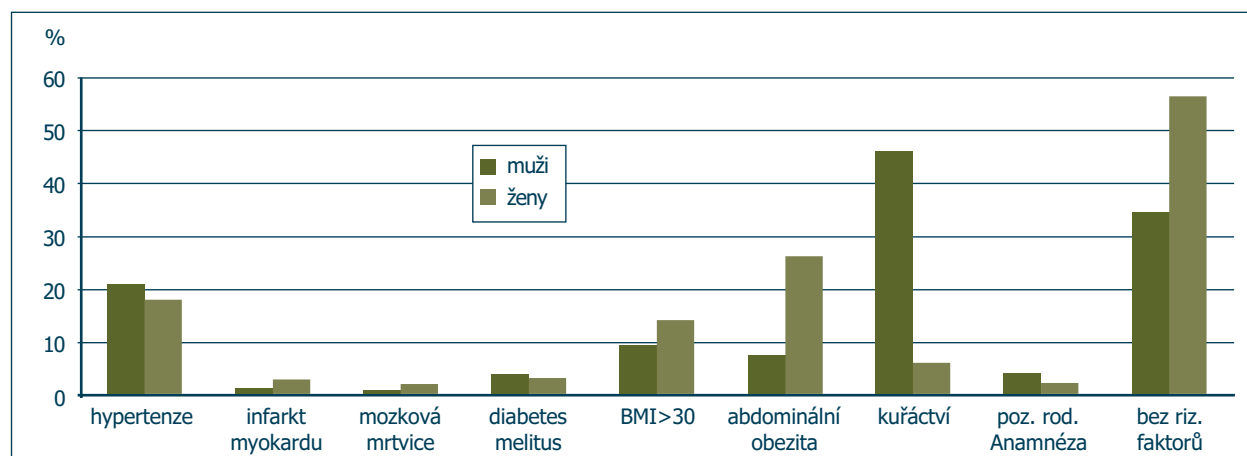
Graf 3 znázorňuje rozložení rizikových faktorů kardiovaskulárních nemocí u vesnické populace. Mezi vyšetřeny nebyl ani jeden diabetik. Žádná z žen neměla infarkt myokardu v anamnéze, nikdo z mužů neměl pozitivní rodinnou anamnézu kardiovaskulárních onemocnění. Kuřáctví je 8,6x častější u mužů než žen, podobně jako ve městě. Bez sledovaných rizikových faktorů byla přibližně jedna třetina mužů a jedna polovina žen.

Na vesnici se léky užívají málo časté. Lékem první volby arteriální hypertenze je u sledovaných jedinců reserpin. Pouze malá část vesnické populace bere ACE inhibitory a blokátory kalciových kanálů. Beta blokátory ani diuretika nebral nikdo z dotázaných.

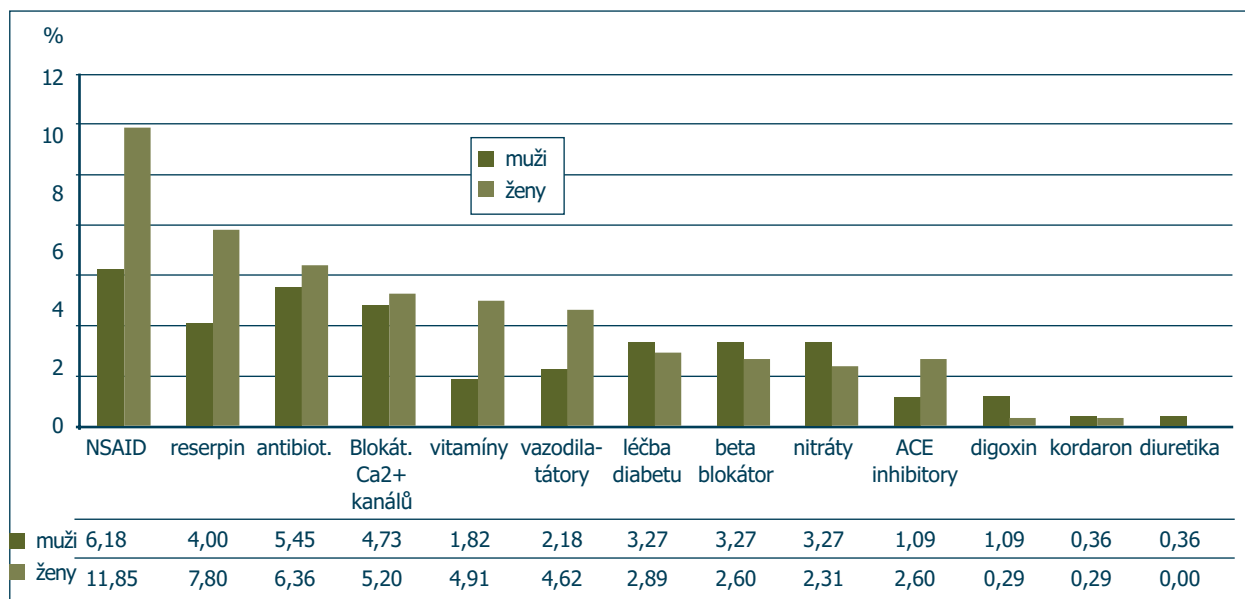
• POLYMORFISMUS APOLIPOPROTEINU E U SLEDOVANÉ POPULACE

Graf 5 ukazuje zjištěné rozložení šesti genotypů apolipoproteinu E ve v doposud vyšetřeném vzorku mongolské populace (n=286). U nikoho nebyl zjištěn genotyp $\epsilon 2 / \epsilon 2$, nejpočetnější je zastoupení genotypu $\epsilon 3 / \epsilon 3$ a dále $\epsilon 3 / \epsilon 4$, stejně je zastoupení $\epsilon 2 / \epsilon 3$ a $\epsilon 2 / \epsilon 4$.

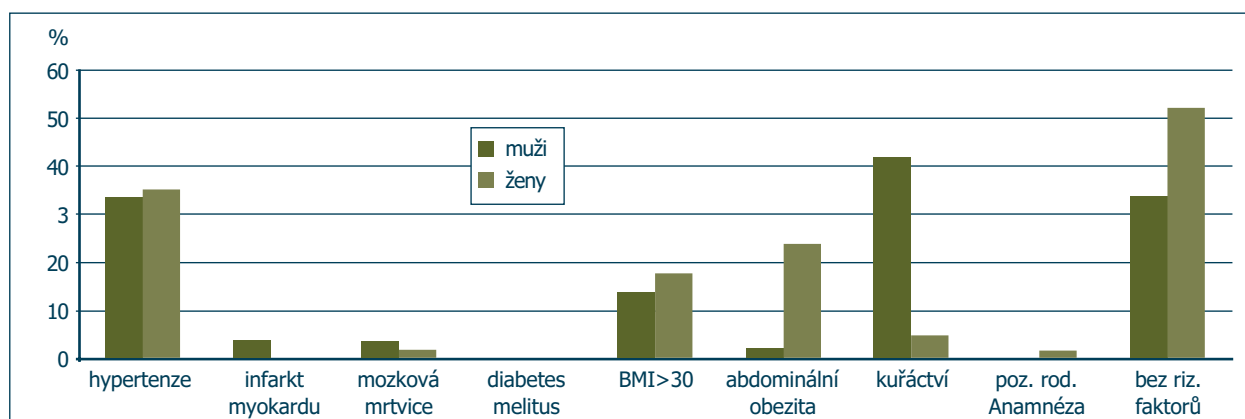
Graf 6 znázorňuje distribuci alel v mongolské populaci. Alela $\epsilon 3$ je nejčastější (79,9%), alela $\epsilon 4$ je přítomna v 16,6%. Nejméně zastoupena je alela $\epsilon 2$, která je přítomná v 3,5%.



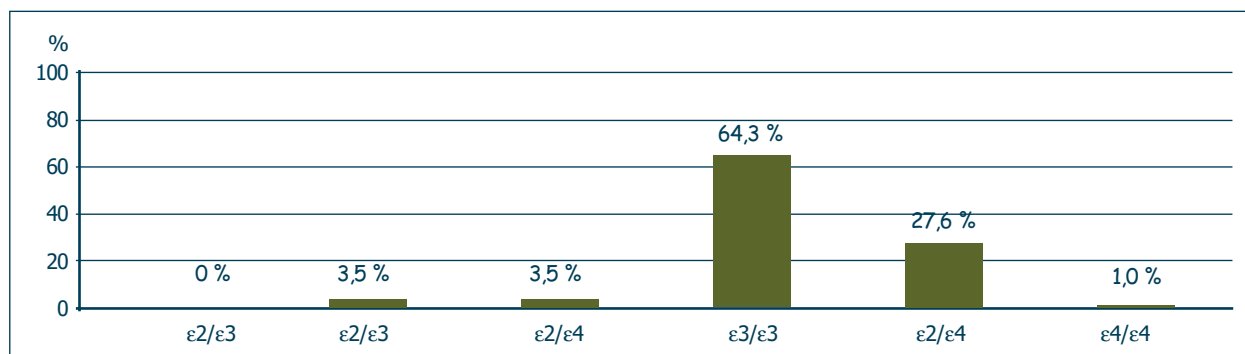
GRAF 1: CHARAKTERISTIKA RIZIKOVÝCH FAKTORŮ - MĚSTO (275 MUŽŮ, 346 ŽEN)



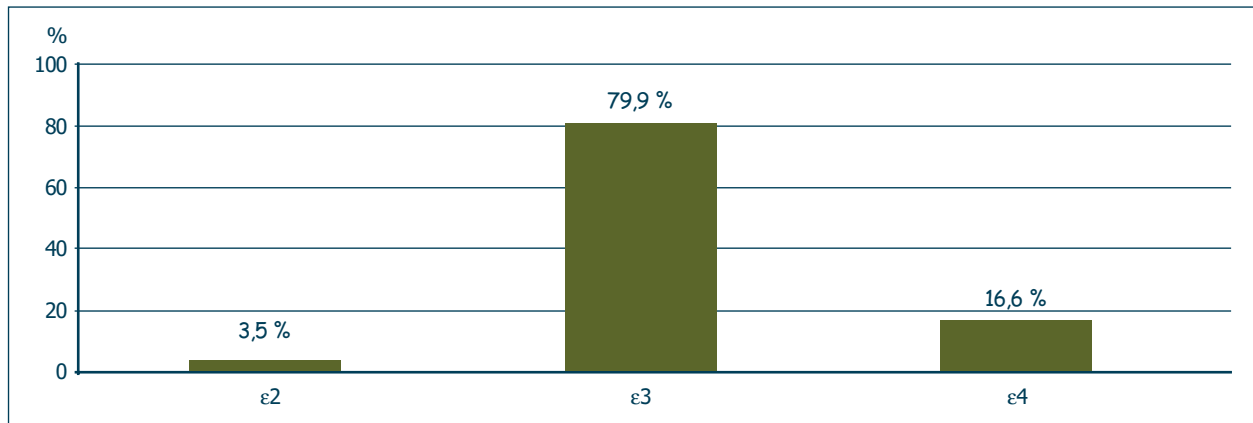
GRAF 2: UŽÍVÁNÍ LÉKŮ - MĚSTO (275 MUŽŮ, 346 ŽEN)



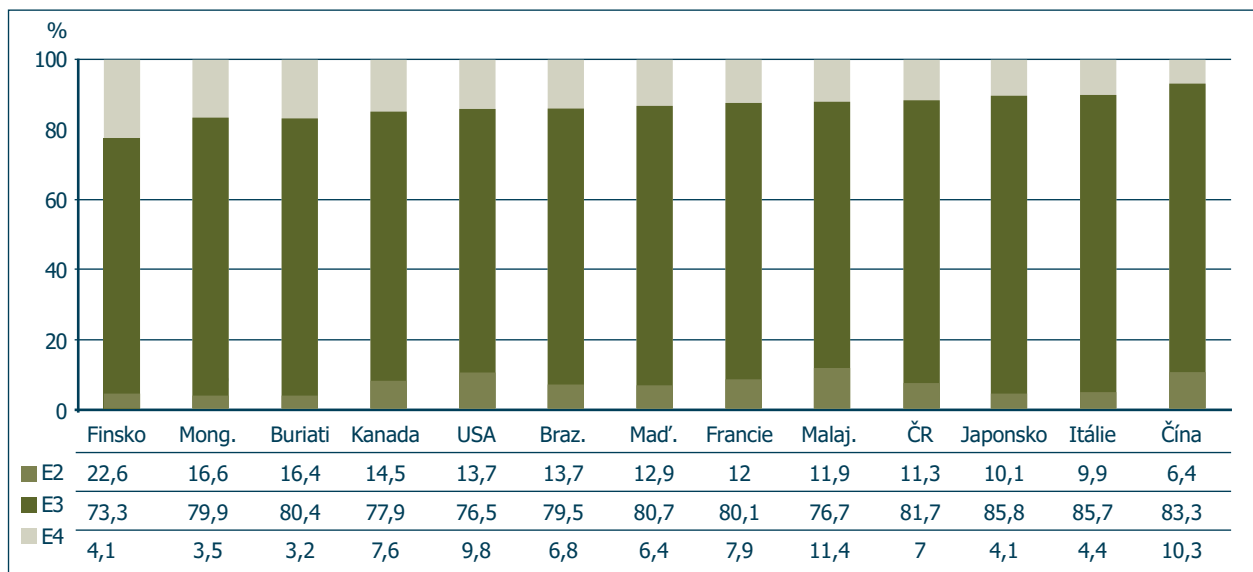
GRAF 3: CHARAKTERISTIKA RIZIKOVÝCH FAKTORŮ - VESNICE (60 MUŽŮ, 63 ŽEN)



GRAF 5: DISTRIBUCE GENOTYPŮ APOLIPOPROTEINU E U SLEDOVANÉ MONGOLSKÉ POPULACE



GRAF 6: DISTRIBUCE ALEL APOLIPOPROTEINU E U SLEDOVANÉ MONGOLSKÉ POPULACE



GRAF 7: FREKVENCE ALEL APOLIPOPROTEINU E V MONGOLSKU VE SROVNÁNÍ SE SVĚTEM

DISKUZE

Mongolsko patří vzhledem k snad největší konzumaci masa na osobu na světě, naprostému nedostatku vlákniny (ovoce a zelenina se musí importovat) k rizikovým populacím. Vyšetřením zjištěná prevalence arteriální hypertenze, obezity a anamnestickými dotazníky odhadovaná prevalence diabetu, infarktu myokardu, mozkové mrtvice a pozitivní rodinné anamnézy kardiovaskulárních onemocnění u městské a vesnické populace je nižší než u české populace (5). Ve vesnické skupině nebyl žádný diabetik, je možné, že diabetes typu II. není diagnostikován a diabetici I. typu se musí přestěhovat do města, kde mohou být kompenzováni. Nízká prevalence infarktu myokardu asi také souvisí s neznalostí symptomů. Arteriální hypertenze je častější na vesnici, pravděpodobně kvůli větší spotřebě soli při přípravě pokrmů a nápojů a méně časté užívání antihypertenziv. Užívání léků „západního typu“ ovlivňuje časté používání bylin, silný vliv tradiční medicíny. Lékem první volby arteriální hypertenze je u obou skupin reserpin a to hlavně z cenových důvodů, beta-blokátory, ACE inhibitory, diuretika a blokátory kalciových kanálů se užívají prakticky jen ve městě, léčba celkově zaostává za zjištěnou prevalencí.

Graf 7 ukazuje námi získané výsledky o distribuci alel apo E v mongolské populaci v porovnání s výsledky publikací o jiných světových populacích. (6) O apo E v Mongolsku byl doposud publikován pouze článek o buriatském etniku na východě Mongolska. Výsledky získané touto studií (n=125) jsou prakticky totožné s námi získanými údaji (doposud vyšetřeno n=286).(7) Nedostatek více údajů o střední Asii však neumožňuje žádné další srovnání.

LITERATURA

- (1) Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PW, Levy D, Osgood D, Parpos S, Pedro-Botet J, Daly JA, Ordovas JM. Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001 Feb 15;154(3):529-37
- (2) Horejsi B, Ceska R. Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein(a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis. *Physiol Res* 2000;49 Suppl 1:S63-9

- (3) *Vrablik M, Horinek A, Ceska R, Poedne R, Hubacek M. Frequency of occurrence of apolipoprotein E isoforms in patients with various types of hyperlipoproteinemias Cas Lek Cesk 1999 Aug 23;138(16):491-4*
- (4) *Strittmatter WJ, Roses AD 1996, Apolipoprotein E and Alzheimer's disease, Annu rev. Neurosci. 19:53-77*
- (5) *Gregůrková M. et al. Zdravotní stav obyvatelstva šesti měst České republiky: prevalence a terapie některých chronických onemocnění Čas. Lék. čes. 140, 2001, No.4, p. 112-117*
- (6) *M. Beránek et al., Apolipoprotein E – struktura, funkce, patofyziologie, genetický polymorfismus, Klin. Biochem. Metab., 5 (26), 1997, No.3, p.146-151*
- (7) *Tsunoda K et al. Apolipoprotein E and H polymorphisms in Mongolian Buryat: allele frequencies and relationship with plasma lipid levels. Hum Biol. 2002 Oct;74(5):659-71.*

3. místo

**SMYKOVÁ RYCHLOST V PŘÍVODNÉ TEPNĚ
DIALYZAČNÍHO CÉVNÍHO PŘÍSTUPU U DIABETIKŮ**

Autoři: Vladimír Tuka (5. ročník), Jan Malík, Jana Rotreklová
Školitel: as. MUDr. Jan Malík, CSc., III. interní klinika 1. LF UK a VFN



Vladimír Tuka

Úvod

Hemodynamické faktory hrají důležitou roli v regulaci průtoku cévami, v remodelaci cév, při rozvoji aterosklerotických lézí. Mezi tyto faktory počítáme také smykovou rychlost a smykové napětí.

Při laminárním proudění můžeme tok tekutiny (krve) v trubicích (cévách) rozdělit na vrstvy, které se po sobě pohybují. Tento pohyb popisuje smyková rychlost a smykové napětí [1]. Smyková rychlost charakterizuje rozdíl rychlostí vrstev tekutiny vztažený na vzdálenost mezi nimi $(v_1 - v_2) / r$, (s^{-1}). Smykové napětí označuje sílu, která uvádí do pohybu pomalejší vrstvu vrstvou rychlejší, vztaženou na jednotku plochy, ($N \cdot m^{-2}$). Budeme-li za pomalejší vrstvu považovat endotel, můžeme hovořit o smykové rychlosti u stěny cévní (wall shear rate, WSR) a o smykovém napětí u stěny cévní (wall shear stress, WSS). Smyková rychlost je nejnižší ve středu cévy, směrem ke stěně se zvyšuje. To samé platí i pro smykové napětí.

Smyková rychlost a smykové napětí jsou na sobě vzájemně závislé veličiny [1]. Závislost mezi nimi popisuje Newtonův zákon elasticity [2]:

$$WSS = \eta * WSR \quad (1)$$

Tutéž závislost vyjadřuje i Poiseuilleův zákon [3]:

$$WSS = (4 * \eta * Q) / (\pi * r^3) \quad (2)$$

kde WSS je smykové napětí, η dynamická viskozita, WSR smyková rychlost, Q průtok a r poloměr cévy [1].

Za fyziologických podmínek je WSR v arteriálním řečišti udržován na konstantní hodnotě [3]. Pokud dojde ke změně WSR, dojde k zapojení regulačních mechanismů sloužících k navrácení WSR k původní hodnotě. Např. zvýšení WSR vlivem zvýšeného průtoku krve, jak je tomu např. při zahájení svalové práce u končetinových tepen, vede k arteriodilataci, a tím k navrácení WSR na původní fyziologickou hodnotu. Analogicky, dojde-li ke snížení průtoku krve distálně za kritickou stenózou, reaguje příslušný úsek tepny zúžením. Dialyzační cévní zkrat je typickým příkladem důsledku dlouhodobého zvýšení průtoku přívodnou tepnou na její dilataci. Příčinou zvýšení průtoku je chirurgické vytvoření arteriovenózní anastomózy, která vede k prudkému poklesu periferní cévní rezistence.

Diabetes mellitus je časté onemocnění. V populaci České republiky je 6,5% diabetiků [4], k rozvoji diabetické nefropatie dochází u 20 až 30% nemocných s diabetem I. typu a u 5 až 15% jedinců s diabetem II. typu [5]. Z pacientů s diabetickou nefropatií plných 30% je postiženo selháním ledvin [4], což představovalo v roce 2002 celkem 16730 osob. Diabetici jsou k hemodialýze indikováni častěji než nediatetici [6] a v chronickém hemodialyzačním programu se u nich vyskytuje více komplikací. Jde mj. o kratší životnost cévního přístupu, častější výskyt ischemie končetiny s cévním zkratem a vznik „steal syndromu“ [7]. Diabetická makroangiopatie a zejména mediokalcinoza omezuje dilataci přívodné tepny [7]. Lze se domnívat, že rozdílné hodnoty WSR jsou jedním z patofyziologických mechanismů rozvoje ischemie končetiny se zkratem jakož i kratší životnosti zkratu. Cílem naší práce bylo srovnání hodnot WSR v přívodné tepně dialyzačního cévního zkratu u diabetiků s nemocnými bez diabetes mellitus.

Metody

Celkem bylo vyšetřeno 31 pacientů s cévním zkratem vycházejícím z a. radialis (11 s diabetem) a 32 pacientů se zkratem vycházejícím z a. brachialis (14 s diabetem) (tabulka 1).

Ultrasonografické vyšetření přívodné tepny cévního zkratu bylo prováděno lineární multifrekvenční sondou (3-11 MHz) přístroje Phillips SONOS 5500. Měření rychlosti toku a průměru přívodné tepny bylo prováděno v úseku s pravidelným lumen 1-3 cm před arteriovenózní anastomózou.

Každý pacient byl vyšetřen vleže. Uprostřed přívodné tepny byla změřena nejnižší, nejvyšší a střední rychlost toku krve, dále byl odečten průměr cévy. Pacienti byli vyšetřováni cca 2 měsíce od založení zkratu, kdy již bylo možno očekávat dosažení cílového průtoku. Současně v této době ještě nedošlo k rozvoji komplikací cévního zkratu.

Předpokládali jsme laminární tok a parabolické (Poiseuilleovo) rozložení rychlostí toku v cévě. WSR jsme vypočítali podle vzorce [8-10]:

$$WSR(s^{-1}) = 4 \cdot v / d,$$

kde v je rychlost toku krve ($m \cdot s^{-1}$) a d je vnitřní průměr tepny (m).

Výsledky jsme porovnali nepárovým t-testem odděleně ve skupině zkratů vycházejících z a. radialis a ve skupině zkratů vycházejících z a. brachialis.

Výsledky

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. WSR nabývá extrémních hodnot v obou skupinách a bez ohledu na přítomnost diabetu. Je-li přívodnou tepnou a. radialis, WSR dosahuje téměř 2,5 násobných hodnot než v případě a. brachialis. Diabetici mají signifikantně vyšší WSR_{max}, WSR_{min} i WSR_{mean} oproti nediabetikům, vychází-li zkrat z a. radialis. Vychází-li zkrat z a. brachialis statisticky významný rozdíl je možno pozorovat pouze pro WSR_{max}, jinak je rozdíl nevýznamný.

Diskuze

V naší studii jsme pozorovali překvapivě vysoké hodnoty WSR v přívodné tepně cévního zkratu, zejména v případě radiocefalického zkratu u diabetiků. WSR dosahuje v přívodné tepně radiocefalického zkratu hodnot, které dosud byly v lidském organismu pozorovány zcela výjimečně.

Většina prací zabývajících se hemodynamickými faktory v cévních zkratech studuje WSS, ale jeho hodnotu získávají nepřímo měřením WSR a výpočtem s použitím arbitrární hodnoty viskozity. Je známo, že viskozita je závislá na mnoha faktorech, mimo jiné na hodnotě WSR [11], hematokritu, proteinech krevní plazmy [12]. U pacientů v hemodialyzačním programu dochází k dlouhodobým změnám krevní viskozity. Viskozita se také významně mění bezprostředně po dialyzační proceduře [13]. Hodnocení WSS lépe odráží působení toku krve na endotelové buňky. K výpočtu WSS je možno použít arbitrární hodnotu viskozity, ale jen u osob, u nichž nepředpokládáme výrazné odchylky od normy. U ostatních pacientů je pro hodnocení WSS nutno viskozitu změřit viskozimetrem. Vzhledem k těmto metodickým nesnázím jsme v naší studii počítali s WSR.

WSR nabývá v lidském organismu fyziologických hodnot v rozmezí 300 až 800 s⁻¹. Při hodnotách kolem 1500 s⁻¹ je aktivován von Willebrandův faktor [14], při hodnotách WSR dosahujících 8000 s⁻¹ dochází k přímé aktivaci destiček. Oba tyto mechanismy jsou spojeny s vyšším rizikem intraarteriální trombózy. WSR v přívodné tepně dosahovala vysokých hodnot v obou skupinách. U diabetiků se WSR již pohybovala v oblasti, kde dochází k přímé aktivaci destiček. Nabízí se spojení mezi časnějšími a častějšími komplikacemi u diabetiků a vysokými hodnotami WSR v přívodné tepně. Tuto hypotézu musí potvrdit nebo vyloučit další výzkum.

Bez ohledu na přítomnost diabetu, WSR dosahovala mnohem vyšších hodnot, byla-li přívodnou tepnou a. radialis. Jak bylo uvedeno v úvodu je reakcí na zvýšení průtoku cévou její dilatace [15, 16]. U diabetiků jsou cévy postiženy mediokalcinózou a aterosklerózou [7], což jednak snižuje bazální průsvit tepny a jednak omezuje vazodilatační schopnost cévy. Tyto léze postupují centrifugálně, postihují tedy dříve distálně uložené tepny [14]. To by mohlo vysvětlit: a) proč mají diabetici signifikantně vyšší WSR v a. radialis oproti nediabetikům a b) proč je WSR v a. brachialis u diabetiků ve srovnání s nediabetiky jen nepatrně vyšší.

Závěr

Diabetici mají statisticky významně vyšší hodnoty smykové rychlosti v přívodné tepně (zejména v případě distálních zkratů). Lze předpokládat, že vysoký WSR je jedním z patofyziologických mechanismů častého rozvoje komplikací cévního zkratu u diabetiků. Je možno očekávat, v souladu s prací Konnera [14], že u diabetiků zkraty vytvořeny s využitím proximálních tepen budou mít delší životnost a méně komplikací.

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří se na této práci podíleli, zejména školiteli Dr. Malíkovi za trpělivé a zkušené rady.

Zkratky

WSR	smyková rychlost (s ⁻¹)
WSS	je smykové napětí (Pa)
η	dynamická viskozita (Pa·s)
Q	průtok (ml·s ⁻¹)
r	poloměr cévy (m)
v	rychlost toku krve (m·s ⁻¹)
d	vnitřní průměr tepny (m)

Reference

1. Bultas, M.: Kardiovaskulární hemoreologie a její klinický význam. 1984: Avicenum.
2. Klimeš, F.: Hydrodynamics of the cardiovascular system, in Biomechanics of the Cardiovascular System, B. Šrámek, J. Valenta, and F. Klimeš, Editors. 1995, Publishers in Technical Science, and Education: Prague. p. 233-325.
3. Malek, A.M., S.L. Alper, and S. Izumo: Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. JAMA, 1999. **282**(21): p. 2035-2042.
4. ÚZIS, Č. Péče o nemocné cukrovkou 2002, in Zdravotnická statistika. 2003, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR; Praha 2, Palackého nám. 4: Praha. p. 1-39.
5. Teplan, V.: Metabolické poruchy při diabetické nefropatii, in Metabolismus a ledviny, J. Letková, Editor. 2000, Grada Publishing: Praha. p. 243-247.
6. Anděl, M.: Renální komplikace, in Diabetes mellitus a další poruchy metabolismu, M. Anděl, Editor. 2001, Galén. p. 80-82.
7. Bouček, P.: Hemodialýza u nemocných s diabetem, in Hemodialýza, S. Sulková, Editor, Maxdorf. p. 477-490.

8. *Gnasso, A., C. Carallo, C. Irace, et al.*: Association Between Intima-Media Thickness and Wall Shear Stress in Common Carotid Arteries in Healthy Male Subjects. *Circulation*, 1996. **94**: p. 3257-3262.
9. *Irace, C., C. Carallo, A. Crescenzo, et al.*: NIDDM Is Associated With Lower Wall Shear Stress of Common Carotid Artery. *Diabetes*, 1999. **48**: p. 193-197.
10. *Jiang, Y., K. Kohara, and K. Hiwada*: Association Between Risk Factors for Atherosclerosis and Mechanical Forces in Carotid Artery. *Stroke*, 2000. **31**: p. 2319-2324.
11. *Hoeks, A.P.G., S.K. Samijo, P.J. Brands, et al.*: Noninvasive Determination of Shear-Rate Distribution Across the Arterial Lumen. *Hypertension*, 1995. **26**: p. 26-33.
12. *Walburn, F.J. and D.J. Schneck*: A constitutive equation for whole human blood. *Biorheology*, 1976. **13**: p. 201-210.
13. *Martínez, M., A. Vayá, J. Alvario, et al.*: Hemorheological alterations in patients with chronic renal failure. Effect of hemodialysis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1999. **21**: p. 1-6.
14. *Konner, K.*: Primary vascular access in diabetic patients: an audit. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000. **15**(9): p. 1317-1325.
15. *Dammers, R., J.H.M. Tordoir, R.J. Welten, et al.*: The effect of chronic flow changes on brachial artery diameter and shear stress in arteriovenous fistulas for hemodialysis. *Int J Artif Organs*, 2002. **25**(2): p. 124-128.
16. *Girerd, X., G. London, P. Boutouyrie, et al.*: Remodeling of the Radial Artery in Response to a Chronic Increase in Shear Stress. *Hypertension*, 1996. **27**: p. 799-803

TABULKA 1. CHARAKTERISTIKY VYŠETŘOVANÝCH OSOB

	A. radialis		A. brachialis	
	Ano	Ne	Ano	Ne
Diabetes				
<i>n</i>	11	20	14	18
Muži/ženy	1/10	6/14	5/9	4/14
Věk (roky)	67 ± 9	61,2 ± 19	65 ± 11	67 ± 11
Doba od založení (dny)	61 ± 47	52 ± 53	73 ± 59	61 ± 54

TABULKA 2. SMYKOVÁ RYCHLOST WSR V JEDNOTLIVÝCH SKUPINÁCH. HODNOTY ZADÁNY JAKO PRŮMĚR ± SMĚRODATNÁ ODCHYLKA; *) PRO P<0,05; **) PRO P<0,01

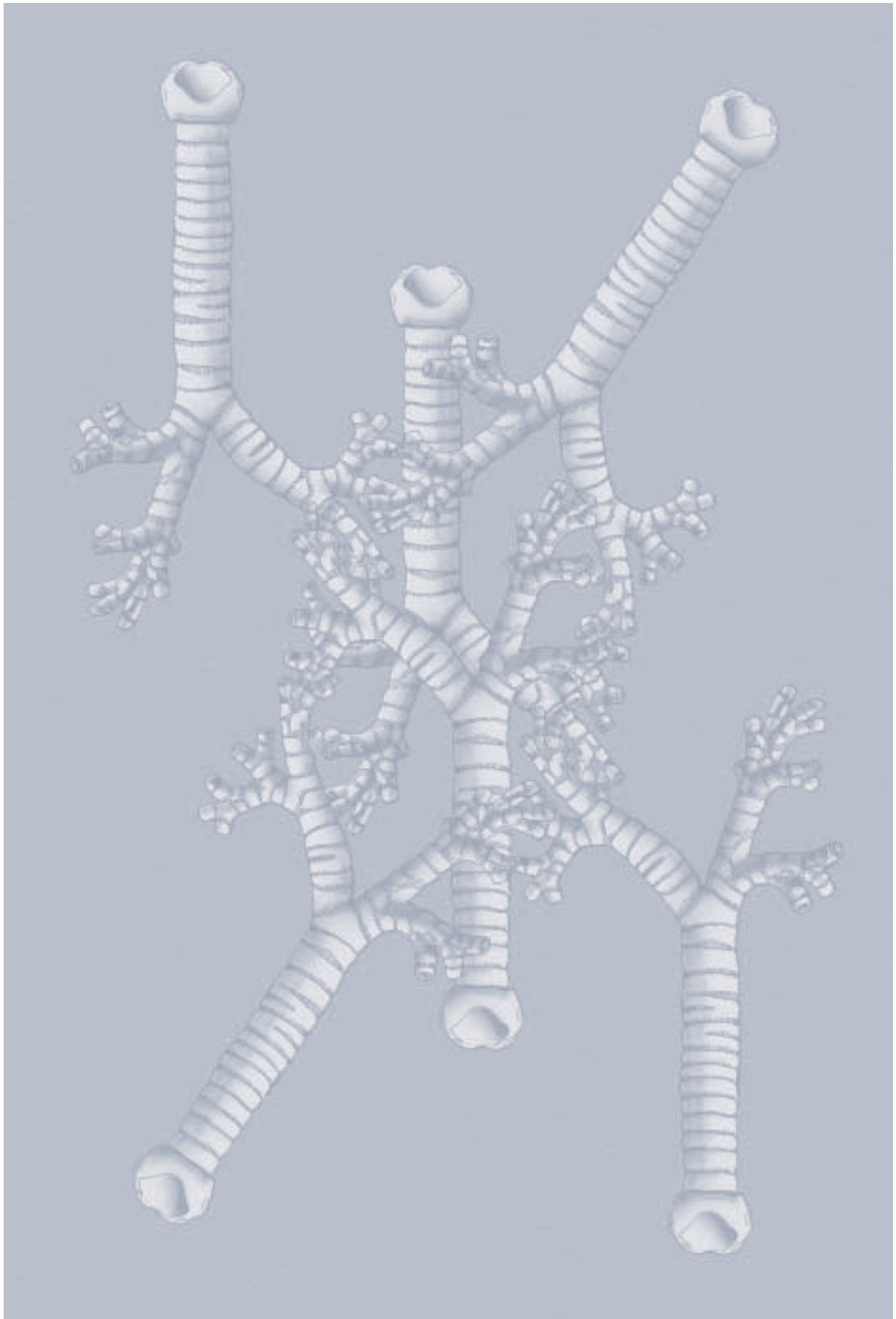
	A. radialis		A. brachialis	
	Ano	Ne	Ano	Ne
Diabetes				
WSR max (s⁻¹)	5047 ± 4145**)	2256 ± 1114**)	2012 ± 579*)	1540 ± 638*)
WSR min (s⁻¹)	2740 ± 1857*)	1461 ± 703*)	1080 ± 382	894 ± 293
WSR mean (s⁻¹)	3734 ± 2906**)	1802 ± 868**)	1445 ± 495	1149 ± 424



V sekci postgraduální (přednášky) se na prvním místě umístil MUDr. Jakub Síkora (na snímku přebírá cenu od děkana fakulty), Ing. Jana Hujová, Mgr. Robert Dobrovolný, Bc. Dana Holanová.



V sekci postgraduální (postery) se na třetím místě umístila MUDr. Helena Svobodová.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY

**1. místo: MUDr. Sikora Jakub, 4.r. PGS
Mgr. Dobrovolný Robert
Ing. Hujová Jana**

Školitelé: Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc., RNDr. Jana Ledvinová, CSc.,
MUDr. Martin Hřebíček

Název práce: „Caenorhabditis elegans has only one a-galactosidase
and α -N-acetylgalactosaminidase ortholog”

2. místo: Ing. Veselá Kateřina, 2.r. PGS

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.

Název práce: „Porucha cytochrom c oxidázy u dívky s fenotypem Werdnig-Hoffmanovy
nemoci a novou mutací 1518delA ve SCO2 genu”

3. místo: MUDr. Kučera Tomáš, 3.r. PGS

Školitelé: Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc., prof. MUDr. Hassan Farghali, DrSc.

Název práce: „Imunohistochemické markery pro detekci apoptózy primárních potka-
ných hepatocitů”

1. místo

CAENORHABDITIS ELEGANS HAS ONLY ONE α -GALACTOSIDASE AND α -N ACETYLGALACTOSAMINIDASE ORTHOLOG

Authors: MUDr. Jakub Sikora, Ing. Jana Hujová, Mgr. Robert Dobrovolný, Bc. Dana Holanová

Advisors: Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc., RNDr. Jana Ledvinová, CSc, MUDr. Martin Hřebíček, Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University, First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic



Jakub Sikora, Jana Hujová, Robert Dobrovolný

Human α -galactosidase A (α -GAL) and α -N-acetylgalactosaminidase (α -NAGA) are true paralogs sharing a common ancestral gene. Deficiencies of these enzymes cause two well-characterized human lysosomal storage disorders - Fabry (α -GAL deficiency) and Schindler (α -NAGA deficiency) diseases.

BlastP searches for orthologs of human α -GAL and α -NAGA revealed a single *C.elegans* gene (CeGAL/NAGA) with significant homology to both human genes.

We elucidated gene organization of CeGAL/NAGA by cDNA sequencing including 3' and 5' UTR. We performed phylogenetic analyses and homology modeling of CeGAL/NAGA based on 3D structure of chicken α -NAGA.

α -GAL and α -NAGA activity measurements in *C.elegans* mixed culture homogenate revealed presence of both enzyme activities. However, the α -GAL activity was completely inhibited by N-acetylgalactosamine – α -NAGA inhibitor.

To study the expression of CeGAL/NAGA in *C.elegans*, we created C-terminal GFP fusion of the whole CeGAL/NAGA ORF under the control of its natural promoter. Presence of CeGAL/NAGAGFP transgene was confirmed at the level of gDNA, cDNA and protein levels. No GFP signal was observed under standard laboratory conditions. We have employed CON A and NH₄Cl treatment in order to alkalise lysosomal pH. Both methods resulted in distinct GFP signal in membrane bound compartment of coelomocytes. Immunofluorescence detection of GFP fusion protein showed transgene expression in muscle and in some cases in gut and vesicular compartments of coelomocytes suggesting differential accessibility of tissues to alkalization treatment.

RNA interference assays directed against the CeGAL/NAGA employing combination of microinjection and feeding approaches have not so far revealed any abnormal phenotype.

The hypothesis of single ortholog in *C.elegans* was further supported by phylogenetic, homology modeling and biochemical analyses. We determined tissue expression and examined the effect of RNAi with the aim to evaluate *C.elegans* as a model organism for Schindler and Fabry diseases.

2. místo

PORUCHA CYTOCHROM C OXIDÁZY U DÍVKY S FENOTYPEM WERDNIIG-HOFFMANOVY NEMOCI A NOVOU MUTACÍ 1518DELA VE SCO2 GENU

Autoři: K. Veselá, H. Hansíková, M. Elleder a J. Zeman, Centrum Integrované genomiky, KDDL a UDMP, 1. LF a VFN

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Klinika dětského a dorostového lékařství, I. LF a VFN



Kateřina Veselá

Úvod

Mitochondrie jsou nepostradatelnou součástí většiny eukaryotických buněk. Působí jako centrum a křižovatka metabolismu sacharidů, lipidů a aminokyselin. Zejména jsou sídlem enzymů β -oxidace mastných kyselin, citrátového cyklu, dýchacího řetězce a ATP-syntázy. Vzhledem k množství procesů souvisejících s těmito organelami, tvoří mitochondriální poruchy molekulárně, biochemicky i klinicky velice heterogenní skupinu onemocnění se závažným postižením funkce především energeticky náročných tkání typu centrální nervové soustavy, svalů a srdce (1).

Jednou z nejčastějších příčin mitochondriálních onemocnění v dětském věku jsou poruchy enzymů dýchacího řetězce, a to zejména jeho IV. komplexu – cytochrom *c* oxidázy (COX). První klinické příznaky většiny pacientů začínají již v kojeneckém nebo batolecím věku a průběh onemocnění mívá obvykle progresivní charakter, který vede k těžkému fyzickému a psychickému postižení a často i k předčasnému úmrtí (2). V současné době neexistuje žádná léčba, která by příznivě ovlivnila průběh onemocnění u pacientů s poruchou COX, terapie je pouze symptomatická a prognóza postižených dětí není příznivá.

V postižených rodinách se často setkáváme s žádostí genetické poradenství a eventuálně i o možnost účinné prenatální diagnostiky v průběhu dalšího těhotenství. Genetické poradenství v rodinách s mitochondriálním onemocněním vždy naráží na řadu problémů. Poruchy energetického metabolismu mohou být zapříčiněny mutacemi v jaderném i v mitochondriálním genomu. Dědičnost poruch způsobených mutacemi v mitochondriální DNA (mtDNA) má svá specifika, mezi která patří heteroplasmie, existence prahové hodnoty pro biochemický projev mutace či replikativní segregace, které dělají prenatální diagnostiku značně riskantní (3,4,5). Pro genetické poradenství je proto důležité pokusit se objasnit molekulární podstatu onemocnění v konkrétní rodině. V průběhu posledních 10 let bylo v naší laboratoři diagnostikováno 66 dětí s poruchou COX na biochemické (enzymatické) úrovni. U třetiny z nich se nám podařilo objasnit molekulární podstatu onemocnění nálezem mutací v nDNA nebo mtDNA. V naší práci předkládáme výsledky molekulárních analýz v nové rodině s izolovanou poruchou cytochrom *c* oxidázy u tříměsíční dívky.

Popis případu

Dívka se narodila ze 2. fyziologického těhotenství zdravých rodičů ve 34. týdnu gestace. Skóre podle Apgarové bylo 4-7-8. Při propouštění z porodnice byl její stav hodnocen jako lehký hypotonický syndrom, ale již v průběhu prvního měsíce života se rozvíjela těžká svalová hypotonie a laryngeální stridor. Progredovalo respirační selhávání, pro které musela být od 2. měsíce na umělé plicní ventilaci. Klinický průběh onemocnění i výsledek vyšetření EMG vedli k podezření na nemoc Werdnig-Hoffman, ale DNA analýza SMA I. genu toto onemocnění nepotvrdila. Navíc kardiologické vyšetření ukázalo progredující hypertrofii interventrikulárního septa způsobující překážku ve výtokovém traktu levé komory. Sonografické vyšetření CNS, které ukázalo nápadnou gyriifikaci a rozšíření subarachnoideálních prostor, svědčilo pro počínající kortikální atrofii. Biopsie n. suralis ukázala extrémní prořídnutí myelinisovaných vláken, nález svědčil pro demyelinizační neuropathii. Dívka zemřela ve věku tří měsíců. Zvýšené hladiny laktátu ve mozkomíšním moku vedly k podezření na mitochondriální etiologii onemocnění. Spektrofotometrické vyšetření aktivit enzymů dýchacího řetězce v izolovaných svalových mitochondriích ukázalo výrazné snížení aktivity COX, zatímco aktivity ostatních komplexů dýchacího řetězce byly v referenčním rozmezí. Dvourozměrná elektroforéza proteinového zastoupení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce ukázala snížení celkového množství COX. Na biochemické úrovni tak byla stanovena diagnóza izolované poruchy cytochrom *c* oxidázy.

Metody

COX je složena ze 13 proteinových podjednotek. Tři největší podjednotky, které formují aktivní centrum komplexu, jsou kódovány v mtDNA, ostatních 10 proteinů je kódováno v jaderné DNA. Kromě těchto genů se na správné funkci a sestavě celého komplexu podílí dalších 30, jaderně kódovaných genů.

1. krok: sekvenování mtDNA

Metodou přímého sekvenování (AlfExpress - Amersham™) byl nalezen polymorfismus 12308A>G v genu pro tRNA leucinu (CUN). Tento polymorfismus byl popsán u pacientů s MELAS syndromem a s makrodelecemi v mtDNA, jako faktor zhoršující klinické příznaky těchto onemocnění. Sám o sobě nemohl být příčinou těžkého onemocnění u dívky, a proto se přistoupilo k dalšímu screeningovému kroku.

2. krok: sekvenování genů pro assemblační proteiny

Dosud byly v souvislosti s COX deficiencí popsány mutace v pěti genech (Tab 1). Vzhledem ke klinickému průběhu onemocnění jsme molekulární analýzu začali u SCO2 genu, který se nachází na 22. chromozomu. SCO2 gen se skládá ze dvou exonů a protein kódující část je dlouhá 801 bp. Protein Sco2 je složen z 266 aminokyselin, nachází se ve vnitřní mitochondriální membráně a slouží jako měď-transportující chaperon. Měď-vazebný motiv CxxxC se nachází mezi cysteiny na pozicích 133 a 137. K analýze byla použita metoda přímého sekvenování (AlfExpress - Amersham™). Nalezené mutace byly potvrzeny restriční analýzou.

Výsledky

U nemocného dítěte byly v kódující sekvenci SCO2 genu nalezeny dvě různé mutace 1518delA a 1541G>A (Obr 1). Dívka je tedy složený heterozygot 1518delA/1541G>A, delece pochází od maminky, transice od otce.

První mutace 1518delA, která nebyla dosud popsána, je delece jedné báze na pozici 1518 (1518delA), která vede k posunu čtecího rámce. Od pozice 132 aminokyselinového řetězce vyvolá syntézu nesmyslného proteinu, který postrádá Cu⁺ vazebné místo (Obr 2). Druhou mutací je transice 1541G>A, která vede k nahrazení kyseliny glutamové na pozici 140 lyzinem. Jedná se o mutaci, která byla nalezena u všech v literatuře dosud popsaných pacientů. Její dopad se vysvětluje změnou konformace terciální struktury vlastního proteinu, která má za následek sníženou afinitu k iontům mědi (6).

Závěr

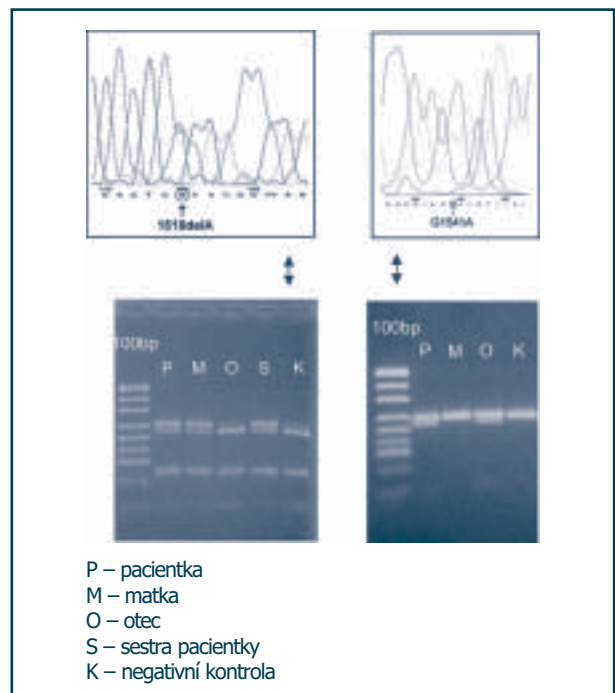
U pacientky s klinickými projevy Werdnig-Hoffmannovy nemoci a izolovanou poruchou cytochrom c oxidázy se podařilo objasnit molekulární podstatu onemocnění. Byla nalezena nová (v pořadí sedmá) mutace v genu SCO2, jehož produkt Sco2 se podílí na assemblaci COX. Vzhledem k tomu, že se jedná o poruchu kódovanou jadernou DNA s autozomálně recesivním typem dědičnosti, bude možno v postižené rodině v případě eventuálního dalšího těhotenství nabídnout možnost prenatální diagnostiky.

Reference

1. Dimauro, S. and Schon, E. A. (2003). Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med* 348(26): 2656-2668.
2. Robinson, B. H. (2001). Prenatal diagnosis of disorders of energy metabolism. *Semin Neurol* 21(3): 269-73.
3. Thorburn, D. R. and Dahl, H. H. (2001). Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 106(1): 102-14.
4. Amiel, J., Gigarel, N., Benacki, A., Benit, P., Valnot, I., Parfait, B., Von Kleist-Retzow, J. C., Raclin, V., Hadj-Rabia, S., Dumez, Y., Rustin, P., Bonnefont, J. P., Munnich, A. and Rotig, A. (2001). Prenatal diagnosis of respiratory chain deficiency by direct mutation screening. *Prenat Diagn* 21(7): 602-4.
5. Faivre, L., Cormier-Daire, V., Chretien, D., Christoph Von Kleist-Retzow, J., Amiel, J., Dommergues, M., Saudubray, J. M., Dumez, Y., Rotig, A., Rustin, P. and Munnich, A. (2000). Determination of enzyme activities for prenatal diagnosis of respiratory chain deficiency. *Prenat Diagn* 20(9): 732-7.
6. Papadopoulou, L. C., Sue, C. M., Davidson, M. M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J. E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D. M., Coster, R. V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D. C., Bonilla, E., Hirano, M., Dimauro, S. and Schon, E. A. (1999). Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 23(3): 333-7.

TAB. 1. GENY PRO ASSEMBLAČNÍ FAKTORY POPSANÉ V SOUVISLOSTI S PORUČOU AKTIVITY COX

SURF1	- Leigh syndrom (svět: x*10 od r.1998; ČR+SR: 9x od r.2000)
SCO1	- hepatopatie, ketoacidózové kóma (svět: 2x od r.2000; ČR+SR: neanalyzováno)
COX10	- tubulopatie, leukodystrofie (svět: 3x od r.2000; ČR+SR: neanalyzováno)
COX 15	- kardiomyopatie (svět: 1x od r.2003; ČR+SR: neanalyzováno)
SCO2	- hypertrofická kardiomyopatie (svět: 15x od r.1999; ČR+SR: 7x od r.2003)



OBR.1 VÝSLEDKY SEKVENAČNÍCH A RESTRIKČNÍCH ANALÝZ SCO2 GENU

3. místo

IMUNOHISTOCHEMICKÉ MARKERY PRO DETEKCI APOPTÓZY PRIMÁRNÍCH POTKANÍCH HEPATOCYTŮ

Autoři: Tomáš Kučera, Nikolína Canová
Školitelé: Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc., Ústav pro histologii a embryologii 1.LF a Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc., Farmakologický ústav 1.LF a VFN



Tomáš Kučera

Úvod

Vliv různých látek s toxickými nebo léčebnými efekty na apoptózu jaterní buňky je významným hlediskem jejich působení. Tyto efekty se sledují *in vitro*, kdy se jako model využívá primárních potkaních hepatocytů, které si na rozdíl od buněčných linií zachovávají po jistou dobu více charakteristických znaků typických pro jaterní buňku *in vivo* (Eckl a Bresgen 2003). Kromě případných toxických efektů různých látek se tento model využívá ke sledování apoptózy při simulaci poškození jater, k jakému dochází při sepsi, cholestáze, ischemii – reperfúzi nebo alkoholizmu (Li a Billiar 1999). V rámci daného experimentu sledujícího vliv látky na viabilitu buněk je důležité rozlišovat mezi programovanou buněčnou smrtí – apoptózou a nekontrolovaným rozvratem buněčného metabolismu končícím lýzou buňky – nekrózou.

Pro detekci apoptózy se užívá řady metod zachycujících proces programované buněčné smrti v jeho nejrůznějších fázích a projevech. Tyto metody sledují morfologické i biochemické změny apoptotických buněk *in vitro* - apoptotické markery (Barrett et al. 2001). Pomocí jednotlivých metod je apoptotický proces sledován na několika úrovních. Změny týkající se buněčného jádra jsou spojeny zejména s fragmentací DNA (Maeda et al. 1995), která může být zachycena při DNA elektroforéze jako charakteristický DNA-žebříček, nebo technikami odhalujícími fragmentaci DNA na úrovni jednotlivých buněk. To umožňuje elektroforéza DNA na úrovni jedné buňky - Comet assay a značení DNA fragmentů technikou TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling; Walker a Quirke 2001). Na úrovni cytoplazmatické membrány dochází při apoptóze ke změnám její stavby, což se projevuje externalizací fosfatidylserinu na zevní list cytoplazmatické membrány, kde je ho možné detekovat specificky se vázajícím proteinem Annexinem V (van Heerde et al. 2000). Dále dochází ke změně propustnosti cytoplazmatické membrány, čehož se využívá při inkorporaci fluorescenčních proub do buněk. Mitochondrie hraje často kritickou úlohu v nastartování a udržování apoptotického procesu a podobně i v integraci vnitřní, stresovými signály indukované, a vnější, receptory smrti iniciované, cesty apoptózy (Green a Reed 1998). Pokles mitochondriového transmembránového potenciálu lze vizualizovat fluorescenční sondou. Následně se z mitochondrií do cytosolu uvolňuje cytochrom c, který je možné detekovat specifickými protilátkami. Lze rovněž prokázat aktivaci proapoptotických molekul z rodiny Bcl-2 (Wang et al. 2003). Významným markerem apoptózy je přítomnost aktivovaných forem komponent apoptotické signální a efektorové sítě. Jedná se o enzymy rodiny „kaspáz“, které se aktivují štěpením jednotlivé kaspázy nebo autokatalyticky (Thornberry a Lazebnik 1998). Iniciační kaspázy, mezi které se řadí kupříkladu kaspáza-8, jsou aktivovány po stimulaci receptoru s takzvanou doménou smrti. Známkou probíhající exekuční fáze apoptózy je průkaz aktivovaných forem kaspázy-9, kaspázy-3, kaspázy-6 a kaspázy-7 (Marshman et al. 2001). Tyto kaspázy působí štěpení specifických substrátů, které nesou označení „substráty smrti“ (Slee et al. 2001). Patří mezi ně například reparační enzym PARP (poly[ADP-ribose]polymerase), součásti jaderného skeletu lamin A a B, intermediární filamta vimentin a cytokeratiny. Štěpné produkty jsou prokazovány protilátkami, rozpoznávajícími specifické epitopy vzniklé činností kaspáz (Lers et al. 1999).

Cílem této práce bylo detekovat některé apoptotické markery při spontánní apoptóze primárních potkaních hepatocytů. Imunocytochemicky jsme prokazovali dvě aktivované (štěpené) efektorové kaspázy – kaspázu-9 a kaspázu-3. Jako jeden z markerů skupiny „substrátů smrti“ jsme detekovali štěpený lamin A. Vzájemné vztahy detekovaných markerů v apoptotické kaskádě jsou symbolicky znázorněny na obr. 1. Výsledky jsme konfrontovali s morfologickým hodnocením buněk na úrovni světelné i elektronové mikroskopie.

Detekované molekuly v apoptotické kaskádě



OBR. 1. SCHÉMA ZNÁZORŇUJÍCÍ INTERAKCE DETEKOVANÝCH MARKERŮ V APOPTOTICKÉ REGULACI. (>) ZNÁZORŇUJE AKTIVACI (ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ).

METODY

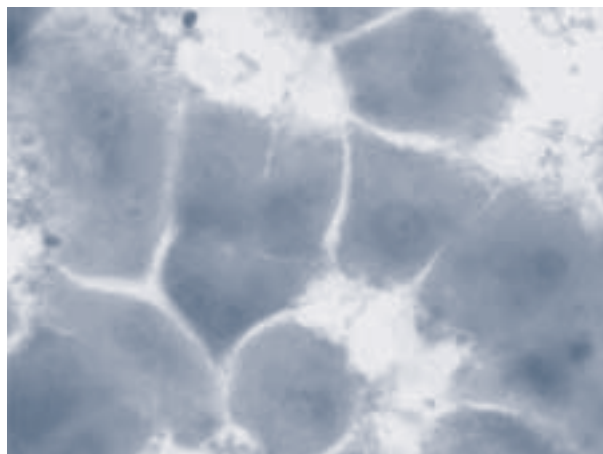
Primární kultury: Primární potkaní hepatocyty byly nasazeny na sterilní krycí skla 22x22 mm potažená kolagenem (rat tail collagen I; Sigma) a umístěná v Petriho miskách o průměru 35 mm. Hepatocyty byly inkubovány 12 hodin při 37°C, v atmosféře s 95% vzduchu a 5% CO₂, v kultivačním mediu William E doplněným gentamicinem, L-glutaminem a 5% FBS.

Zpracování kultur pro morfologické hodnocení: Pro světelnou mikroskopii byly kultury fixovány 4% paraformaldehydem a barveny metodou hematoxylin-eosin. Pro elektronovou mikroskopii (EM) byly buňky nejdříve fixovány 15 min v Karnovského směsi při 4°C, poté uvolněny z krycího skla, postfixovány OsO₄, umístěny do agarových krychliček, odvodněny a nakonec zality do Eponu 812. Byly zhotoveny ultratenké řezy a po dvojitém kontrastování vyšetřovány v elektronovém mikroskopu.

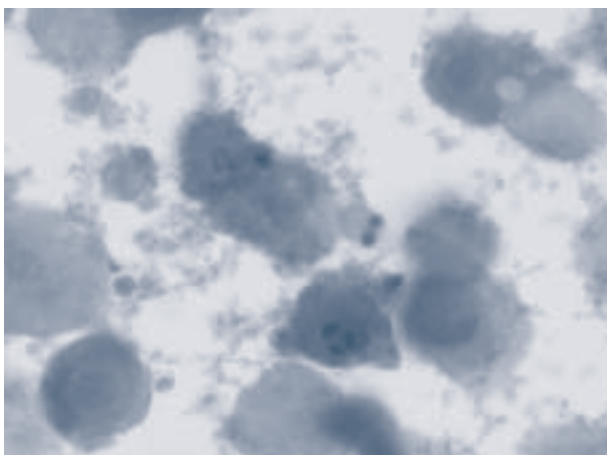
Imunocytochemická detekce: Pro detekci aktivované kaspázy-3 byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem 20 min při 4°C a poté permeabilizovány v 0,1% Tritonu X-100. Nespecifické vazby byly blokovány 5% normálním kozím sérem (NGS) v Tris-NaCl + 0,1% Triton X-100 (TBS/T) po dobu 60 min. Krycí skla s buňkami byla inkubována přes noc ve 4°C s králičí polyklonální protilátkou anti-cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling Technology) ředěnou 1:800 v TBS/T + 5% NGS. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována 0,6% peroxidem vodíku v TBS po dobu 30 min. Detekce navázané primární protilátky byla provedena pomocí DAKO EnVision+ kit, peroxidase, Rabbit (DAKO) 30 min při laboratorní teplotě. Po vizualizaci s užitím diaminobenzidinu jako substrátu pro peroxidázu byla jádra dobarvena hematoxylinem. Detekce štěpeného laminu A a aktivované kaspázy-9 proběhla podle obdobného protokolu těmito primárními králičími protilátkami (Cell Signaling Technology): anti-cleaved lamin A (Asp230) ředěná 1:100 v TBS a anti-cleaved caspase-9 (Asp353) ředěná 1:400 v TBS.

Výsledky

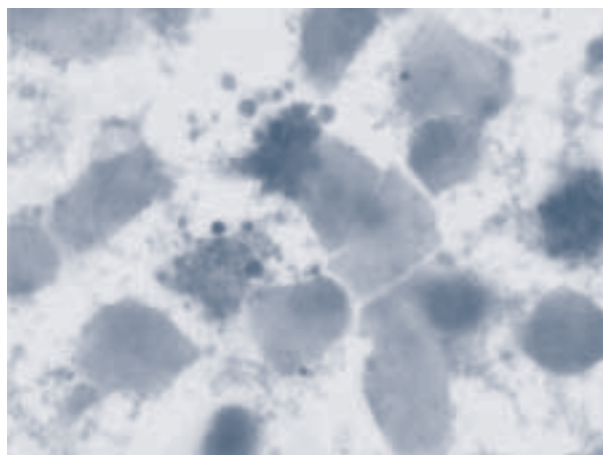
Po 12ti hodinové inkubaci bylo možné v hematoxylin-eosinem barvených preparátech pozorovat u primárních potkaních hepatocytů výskyt zanikajících buněk. Kultura byla tvořena viabilními hepatocyty adheujícími k substrátu, které vytvářely subkonfluentní „monolayer“, měly oploštělý tvar a obsahovaly velké jádro s rovnoměrně rozptýleným chromatinem a viditelným jadérkem (Obr. 2). Buňky zanikající procesem apoptózy bylo možné identifikovat podle kompaktní eosinofilní cytoplazmy tvořící cytoplazmatické výchlípky „blebs“ a podle charakteristických změn jádra, které se projevovaly kondenzací chromatinu přiléhajícího k jadernému obalu (Obr. 3). Tyto buňky se pak rozpadaly na apoptotická tělíška obsahující jaderné fragmenty (Obr. 4). Nekrotické hepatocyty se odlučovaly od substrátu, měly špatně se barvící granulovanou cytoplazmu a pyknotická jádra (Obr. 5). Nálezy na úrovni světelné mikroskopie byly potvrzeny elektronmikroskopicky, kdy byl rozdíl mezi apoptotickými a nekrotickými hepatocyty dán zejména přítomností intaktních membránových struktur v apoptotických buňkách.



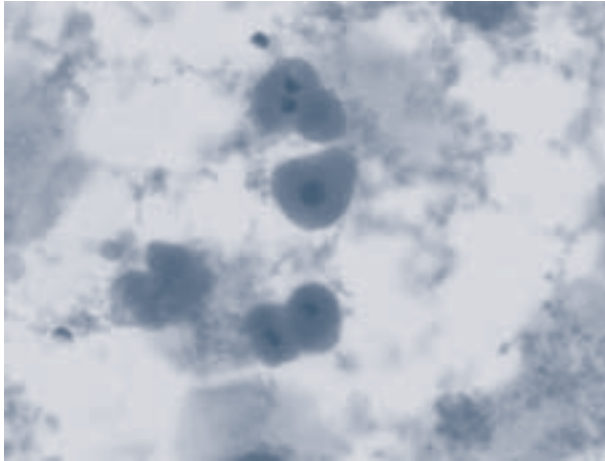
OBR. 2. VIABILNÍ A K SUBSTRÁTU PŘISEDLÉ HEPATOCYTY PO 12 HOD INKUBACI. BARVENÍ HEMATOXYLIN EOSIN. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.



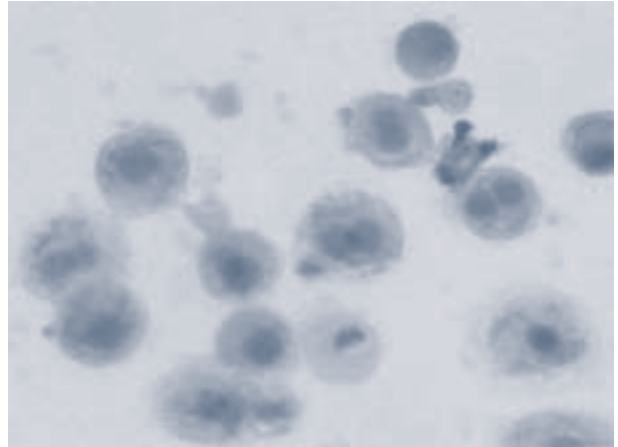
OBR. 3. DVA APOPTOTICKÉ HEPATOCYTY S EOZINOFILNÍ CYTOPLAZMOU TVOŘÍCÍ VÝCHLÍPKY. JÁDRA VYKAZUJÍ NÁSTĚNNOU CHROMATÓZU. BARVENÍ HEMATOXYLIN-EOSIN. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.



OBR. 4. APOPTOTICKÉ BUŇKY ROZPADAJÍCÍ SE NA APOPTOTICKÁ TĚLÍŠKA. BARVENÍ HEMATOXYLIN-EOSIN. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.

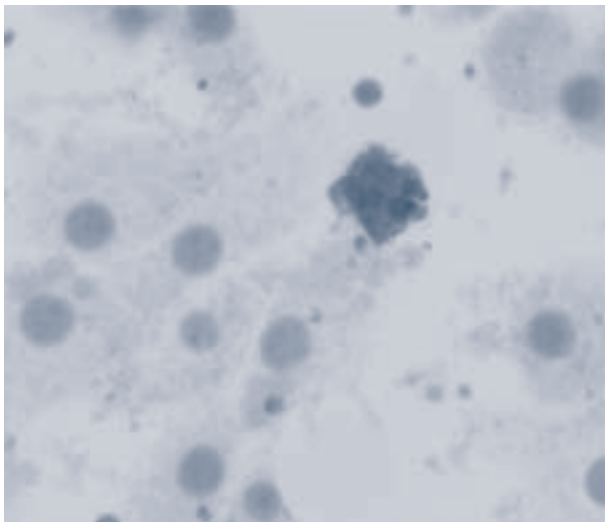


OBR. 5. NEKROTICKÉ BUŇKY S PYKNOTICKÝMI JÁDRY A ZRNITOU ŠEDĚ ZBARVENOU CYTOPLAZMOU, KTERÉ ZTRATILI KONTAKT S KOLAGENNÍM SUBSTRÁTEM. BARVENÍ HEMATOXYLIN-EOSIN. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.

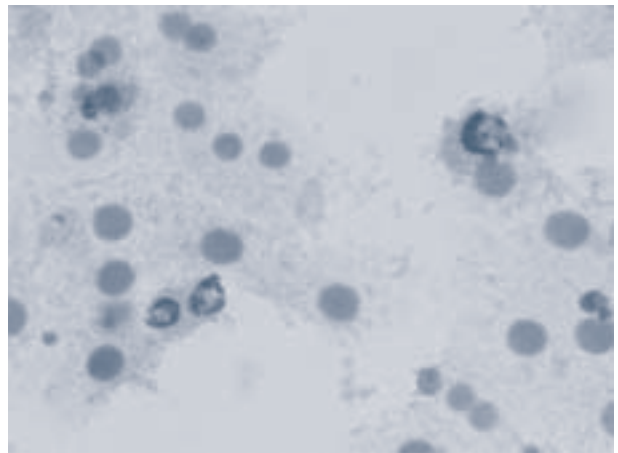


OBR. 6. IMUNOCYTOCHEMICKÁ DETEKCE ŠTĚPENÉ KASPÁZY-3 V PRIMÁRNÍ KULTUŘE POTKANÍCH HEPATOCYTŮ. IMUNOPOZITIVITA JE VÁZÁNA NA CYTOPLASMU BUŇKY S APOPTOTICKÝMI ZNAKY. BUŇKA OBSAHUJE FRAGMENTY JÁDRA. VIABILNÍ A ADHERUJÍCÍ BUŇKY, JAKO I BUŇKY NEKROTICKÉ JSOU NEGATIVNÍ. IMUNOPEROXIDÁZOVÁ REAKCE S DIAMINOBENZIDINEM (HNĚDÝ REAKČNÍ PRODUKT). DOBARVENÍ JADER HEMATOXYLINEM. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.

Výsledky imunocytochemické detekce apoptotických markerů ukázaly rozdílnou míru shody mezi jednotlivými markery a hodnocením buněčné viability i buněčné smrti podle morfologických kritérií. Pozitivita pro aktivovanou kaspázu-3 byla detekovatelná pouze v buňkách s „typicky apoptotickými“ znaky. Všechny nekrotické a viabilní hepatocyty byly negativní (Obr. 6). Imunoreaktivita pro štěpenou kaspázu-9 a štěpený lamin A byla pravidelně nalézána v buňkách s apoptotickou morfologií (Obr. 7, 8). U těchto markerů byla zaznamenána vazba i na část buněk řazených k nekrotickým podle jejich vzhledu a ztráty kontaktu se substrátem (Obr. 9, 10). Viabilní hepatocyty, i značná část nekrotických, byly však negativní pro všechny apoptotické markery.



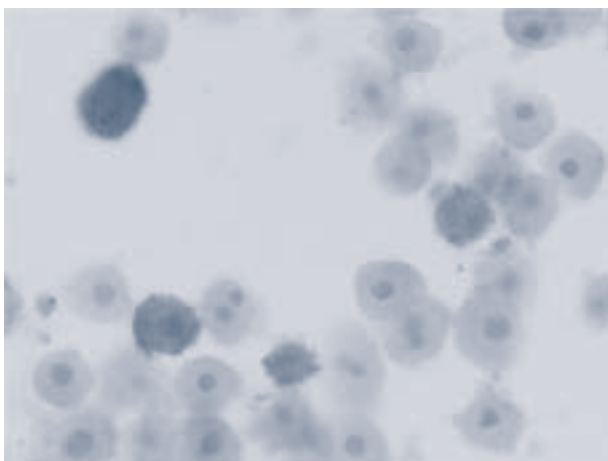
OBR. 7. IMUNOPOZITIVITA PRO ŠTĚPENOU KASPÁZU-9 JE PATRNÁ V CYTOPLAZMĚ APOPTOTICKÉHO HEPATOCYTU. IMUNOPEROXIDÁZOVÁ REAKCE S DIAMINOBENZIDINEM (HNĚDÝ REAKČNÍ PRODUKT). DOBARVENÍ JADER HEMATOXYLINEM. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.



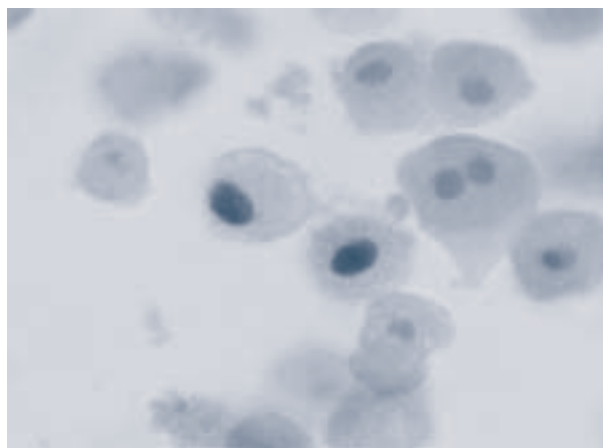
OBR. 8. PRŮKAZ ŠTĚPENÉHO LAMINU A S JADERNOU LOKALIZACÍ. POZITIVITA JE VÁZÁNA NA KONDENZOVANÝ CHROMATIN PŘÍLEHLÝ K JADERNÉ MEMBRÁNĚ JEDNO- I DVOUJADERNÉ APOPTOTICKÉ BUŇKY. JÁDRA SOUSEDNÍCH VIABILNÍCH BUNĚK OBSAHUJÍCÍCH INTAKTNÍ LAMIN A JSOU NEGATIVNÍ. IMUNOPEROXIDÁZOVÁ REAKCE S DIAMINOBENZIDINEM (HNĚDÝ REAKČNÍ PRODUKT). DOBARVENÍ JADER HEMATOXYLINEM. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.

ZÁVĚR

Byla zhodnocena použitelnost tří imunocytochemicky detekovatelných apoptotických markerů v primární kultuře potkaních hepatocytů. Užitím protilátek proti aktivované kaspáze-3, aktivované kaspáze-9 a štěpenému laminu A, je možné detekovat apoptotické hepatocyty, které se nalézají v exekuční fázi programované buněčné smrti, jež představuje nenávratný děj vedoucí k zániku buňky. Ukázalo se, že detekce aktivované kaspázy-3 nejlépe odpovídá hodnocení apoptózy podle morfologických kritérií. U buněk v pozdější fázi apoptotického procesu pozitivita pro tento marker mizí. Tento



OBR. 9. IMUNOPOZITIVITA PRO ŠTĚPENOU KASPÁZU-9 V CYTOPLAZMĚ ČÁSTI NEKROTICKÝCH BUNĚK. IMUNOPEROXIDÁZOVÁ REAKCE S DIAMINOBENZIDINEM (HNĚDÝ REAKČNÍ PRODUKT). DOBARVENÍ JADER HEMATOXYLINEM. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.



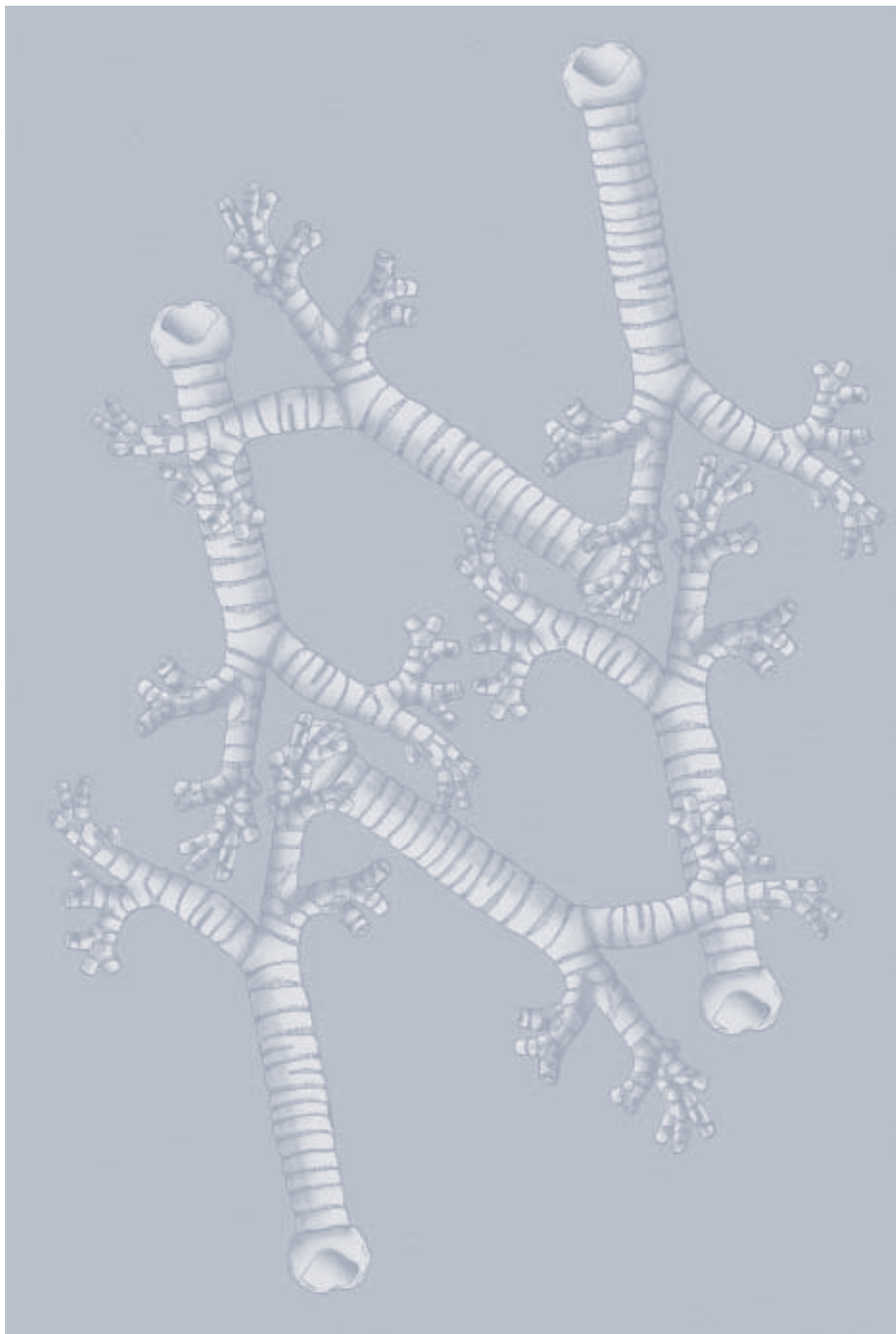
OBR. 10 PRŮKAZ ŠTĚPENÉHO LAMINU A S JADERNOU LOKALIZACÍ V (SEKUNDÁRNĚ) NEKROTICKÝCH BUŇKÁCH. IMUNOPEROXIDÁZOVÁ REAKCE S DIAMINOBENZIDINEM (HNĚDÝ REAKČNÍ PRODUKT). DOBARVENÍ JADER HEMATOXYLINEM. ZVĚTŠENÍ OBJ. 63X.

charakter imunoznačení byl částečně odlišný od výsledků imunocytochemické detekce ostatních markerů, které značily i buňky, které se nalézaly zřejmě ve stadiu sekundární nekrózy. Perzistující imunopozitivita pro štěpenou kaspázu-9 a štěpený lamin A je pravděpodobně dána vyšší rezistencí těchto dvou nově vzniklých epitopů vůči nespecifickému štěpení během lytické smrti buňky. Mohl by to být též důsledek polyklonálního charakteru užitých protilátek, které mohou rozpoznávat dosud nepoškozená vazebná místa. Otázka, zda-li aktivovaná forma kaspázy-9 je v sekundárně nekrotických buňkách stále enzymaticky aktivní, nemohla být užitými metodami zodpovězena. Na základě negativního značení těchto buněk pro štěpenou kaspázu-3, která je právě kaspázou-9 aktivována (Slee et al. 1999), je možno předpokládat ztrátu enzymatické aktivity kaspázy-9 v pozdější fázi programované buněčné smrti. Pro přesnou detekci apoptózy je tedy nutno souběžně používat více metod, které postihují různé fáze apoptotického procesu. Morfologické srovnávací vyhodnocení však musí být provedeno vždy pro ověření správnosti výsledků.

Tato práce byla podporována z výzkumného záměru J 13/98 111100002-6 MŠMT ČR.

CITACE

- 1) Eckl P.M., N. Bresgen: *The cultured primary hepatocyte and its application in toxicology. J. Appl. Biomed.* 1: 117-126, 2004.
- 2) Li J., T.R. Billiar: *Nitric Oxide IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. Am. J. Physiol.* 276: G1069-1073, 1999.
- 3) Wang P., A.J. Valentijn, A.P. Gilmore, C.H. Streuli: *Early events in the anoikis program occur in the absence of caspase activation. J. Biol. Chem.* 278: 19917-19925, 2003.
- 4) Maeda S., A. Suzuki, K.-H. Lin, H. Inagaki, T. Saito: *DNA fragmentation induced in high-cell-density culture of primary rat hepatocytes is an active process dependent on energy availability, gene expression, and calmodulin. J. Biochem.* 118: 1161-1165, 1995.
- 5) J.A. Walker, P. Quirke: *Viewing apoptosis through a 'TUNEL'. J. Pathol.* 195: 275-276, 2001.
- 6) Barrett K.L., J.M. Willingham, A.J. Garvin, M.C. Willingham: *Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. J. Histochem. Cytochem.* 49: 821-832, 2001.
- 7) van Heerde W.L., S. Robert-Offerman, E. Dumont, L. Hofstra, P.A. Doevendans, J.F.M. Smits, M.J.A.P. Daemen, C.P.M. Reutelingsperger: *Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. Cardiovasc. Res.* 45: 549-559, 2000.
- 8) Green D.R., J.C. Reed: *Mitochondria and apoptosis. Science* 281: 1309-1312, 1998.
- 9) Thornberry N.A., Y. Lazebnik: *Caspases: enemies within. Science* 281: 1312-1316.
- 10) Marshman E., P.D. Ottewell, C.S. Potten, A.J.M. Watson: *Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. J. Pathol.* 195: 285-292, 2001.
- 11) Slee E.A., A. Colin, S.J. Martin: *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. J. Biol. Chem.* 276: 7320-7326, 2001.
- 12) Slee E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.-G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E. S. Alnemri, D.R. Green, S.J. Martin: *Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, -10 in a caspase-9-dependent manner. J. Cell Biol.* 144: 281-292, 1999.
- 13) Leers M.P.G., W. Kölgen, V. Björklund, T. Bergman, G. Tribbick, B. Persson, P. Björklund, M. Nap, H. Jörnvall, B. Schutte: *Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J. Pathol.* 187: 567-572, 1999.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY

1. místo : Mgr. Zatloukalová Eva, 3.r. PGS

Školitelka: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Název práce: „Originální příprava imunoafinitních nosičů pomocí afinitní sorpce na imobilizovaných kovových iontech“

2. místo: MUDr. Mikšovský Martin, 2.r. PGS

Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc.

Název práce: „Porovnání jednotlivých mikropreparačních technik při léčbě časné kariézní léze“

3. místo: Mgr. Svobodová Helena, 1.r. PGS

Školitel: Doc. MUDr. Richard Češka, CSc.

Název práce: „Mutační analýza v genu pro apoprotein B u české populace obézních dětí a osob s diagnózou ischemické choroby srdeční“

1. místo

ORIGINÁLNÍ PŘÍPRAVA IMUNOAFINITNÍCH NOSIČŮ POMOCÍ AFINITNÍ SORPCE NA IMOBILIZOVANÝCH KOVOVÝCH IONTECH**Autorka:** Mgr. Eva Zatloukalová**Školitel:** Ing. Zdenka Kučerová, CSc., Ústav patologické fyziologie 1.LF*Eva Zatloukalová*

Imunoafinitní chromatografie je moderní technika pro separaci specifických proteinů z komplexní směsi. Pomocí imunoafinitních nosičů lze též imobilizovat proteiny a zvýšit tak jejich stabilitu, nebo je možné pomocí imunoafinitně navázaných enzymů připravit enzymové reaktory.

Při přípravě imunoafinitního nosiče byla využita přirozená afinita protilátek k imobilizovaným kovovým iontům. Tato metoda je výhodná zejména u ptačích imunoglobulinů, které nelze vázat k proteinům A a G a možnosti jejich orientované imobilizace tím byly dosud poněkud omezeny. Při vývoji metody jsme vycházely z faktu, že imunoglobuliny lze separovat pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech (IMAC-Co²⁺). Imobilizované kobaltnaté ionty s orientovaně navázanou protilátkou byly oxidovány pomocí roztoku peroxidu vodíku na ionty kobaltité, čímž se vazba protilátky na kovové ionty stala ireverzibilní. Během oxidace však docházelo k poškození protilátky a jejímu uvolnění z nosiče. Proto byl postup přípravy nosiče modifikován a imunoglobuliny byly navázány až na nosič s oxidovanými kobaltitými ionty. Zároveň bylo vyloučeno oxidační působení peroxidu vodíku na protilátku, a bylo tak minimalizováno její poškození. Nеспецифické interakce proteinů s neoxidovanými kobaltnatými ionty byly omezeny promytím nosiče roztokem EDTA a nespecificky navázané proteiny byly odstraněny roztokem imidazolu a močoviny.

Protilátka navázaná na nosič s oxidovanými kobaltitými ionty (Co³⁺-IDA-Sepharosa) byla stabilní a zachovala si svoji aktivitu.

2. místo

**POROVNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH
MIKROPREPARAČNÍCH TECHNIK PŘI LÉČBĚ ČASNÉ
KARIÉZNÍ LÉZE**

Autor: MUDr. Martin Mikšovský
Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc., Výzkumný Ústav Stomatologický,
I. LF a VFN



Martin Mikšovský

Minimálně intervenční stomatologie je směr zubního lékařství založený na relativně nové filosofii přístupu k zubnímu kazu. Z pohledu MIS je zubní kaz jedním z řady onemocnění, která lze léčit a v některých případech i vyléčit. Základem tohoto přístupu je diagnostika léze v iniciálním stadiu. Následně ošetření pak respektuje vztah mezi biomechanickou funkcí zubu a jeho anatomickými strukturami. Právě zachování těchto významných struktur na povrchu zubu je hlavním argumentem minimálně invazivního přístupu.

Pro preparaci kavit v rámci MIS (mikropreparaci) se používá velké množství přístrojů a nástrojů umožňujících maximální ochranu zdravých zubních tkání ohraničujících kazivé ložisko. K dispozici jsou speciální rotační nástroje s pracovními hlavičkami o velmi malém průměru pohybujícím se často v desetínách milimetru (Fissurotomy – SS White, Micro Prep - Bush). Dalšími zástupci jsou speciální diamantované koncovky aplikovatelné do odstraňovačů zubního kamene, které umožňují přístup k aproximálně či okluzně uloženému kazu bez poškození sousedního zubu (SONICflex - KaVo). Ruční nástroje zahrnující dlátka na sklovinu a exkavátory nejrůznějších tvarů a velikostí, doplněné prostředky sloužícími k chemické degradaci kazivých hmot jsou na tuzemském trhu již delší dobu (Carisolv - Mediteam). Na druhé straně přístroje odstraňující zubní kaz pomocí air-abraze (RONDOflex - KaVo) jsou zatím u nás rozšířeny jen velmi sporadicky. Tyto přístroje však mají široké spektrum použití v terapii, diagnostice a prevenci zubního kazu.

Přestože náš dentální trh nabízí pestrou škálu mikropreparačních zařízení, jejich rozšíření v praxích českých zubních lékařů je zatím velmi sporadické. Při kurzech pořádaných naším pracovištěm jsme zjistili dvě základní příčiny tohoto stavu. Obě souvisejí s ekonomickou stránkou provozování stomatologické praxe. První příčinou je relativně vysoká pořizovací cena těchto zařízení a skutečnost, že minimálně intervenční ošetření nespadá do péče hrazené zdravotními pojišťovnami. Lékařům tudíž nezbývá nic jiného než nechávat pacienty za toto ošetření platit. To se však v řadě hlavně venkovských ordinací jeví jako problém.

Druhým faktorem nezanedbatelným v mnohdy pacienty předimenzovaných ordinacích je časová náročnost ošetření. Všeobecně je rozšířen názor, že mikropreparační techniky jsou podstatně náročnější na čas ve srovnání s klasickou preparací pomocí vrtáčků a brousků. Jasně výhody plynoucí ze šetrného přístupu k zubním tkáním a téměř absolutní bezbolestnost ošetření, které tudíž nevyžaduje aplikaci lokální anestezie, nejsou zatím většinou pacientů a bohužel ani stomatologů známy.

Hlavním cílem naší studie bylo porovnání jednotlivých preparačních technik z hlediska časové náročnosti a bolestivosti ošetření. Na rastrovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-5500 LV byly pořízeny série snímků dokumentující působení jednotlivých technik na tvrdé zubní tkáň.

Ve studii bylo použito air abrazivní zařízení RONDOflex firmy KaVo (částice Al_2O_3 27 μm), airscaler SONICflex firmy KaVo, mikropreparační vrtáčky Fissurotomy firmy SS White a klasické šestibřité vrtáčky doplněné diamantovanými brousíky firmy Medin. Pomocí těchto zařízení bylo ošetřeno 276 molárů (142 pacientů) s fisurálními kazy přibližně stejné velikosti zasahujícími na dentino-sklovinnou hranici. Kazy byly diagnostikovány klinickým vyšetřením doplněním o vyšetření pomocí laserové fluorescence – Diagnodent a radiologicky. Pacienti byli rozděleni do čtyř skupin a každá byla ošetřena jinou technikou. Klasická preparace končila aplikací amalgámových výplní, při mikropreparaci byla jako výplňový materiál použita nízkoviskózní kompozita Flow line firmy Kulzer. Čas ošetření byl měřen od začátku preparace po dokončení výplně. Po skončení ošetření byli pacienti vyzváni, aby vyplnili na pětistupňové škále míru bolestivosti ošetření. Znamka „1“ znamená absolutně bezbolestný zákrok, známka „5“ pacient vyžaduje při ošetření anestezii. Výsledky byly poté statisticky zpracovány a vyhodnoceny. Na rastrovacím elektronovém mikroskopu byly zhotoveny na zubech preparovaných in vitro jednotlivými preparačními přístroji série snímků znázorňující působení jednotlivých technik na povrch tvrdých zubních tkání.

Po vyhodnocení údajů byly zjištěny tyto výsledky. Nejkratší průměrný čas ošetření byl naměřen u klasické preparaci ukončené amalgámovou výplní - 6 min 35 s. Mikropreparace pomocí vrtáčků Fissurotomy s flow-kompozitní výplní trvala 7 min 15 s, pro ošetření SONICflexem bylo zapotřebí 8 min 55 s a nejpomalejší byla air abraze prováděná přístrojem RONDOflex, její délka byla 10 min 5 s. Opačné pořadí bylo zjištěno u bolestivosti zákroku. Air abraze byla pro celou skupinu pacientů naprosto bezbolestná (průměrná známka 1,0). U preparace SONICflexem a fisurotomickými vrtáčky



byla zaznamenán přibližně stejný velmi nízký stupeň bolestivosti (průměrné známky 2,1 a 2,3). Jako nejbolestivější metoda se ukázala klasická preparace (průměr 4,2). Na snímcích z elektronového mikroskopu je jasně vidět, že zatímco klasické preparační technologie zanechávají na stěnách kavity rozsáhlá poškození způsobující preparační trauma, mikro-preparace je k tvrdým zubním tkáním podstatně šetrnější.

Naměřené výsledky přesvědčivě dokazují, že se doba potřebná pro ošetření iniciální kazivé léze v rámci minimální intervence výrazně neliší od standardně používaných rotačních technik. Téměř absolutní bezbolestnost těchto zákroků umožňuje pohodlnější spolupráci s pacientem a odbourává nutnost použití lokální anestezie se všemi známými negativními důsledky. Přestože minimálně invazivní způsob ošetření kazu nespadá do výkonů hrazených ze zdravotního pojištění a pacienti ho platí v plné výši, je jimi vysoce oceňován a během dvouleté práce s mikropreparačními technologiemi jsme zaznamenali zvýšenou poptávku po možnosti ošetření právě těmito technikami.

„Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru VÚS-VFN č. 0002377901“

Literatura

1. White J.M., Eakle W.S. Rationale and treatment approach in minimally invasive dentistry. *JADA* 2000;131:13-19
2. Mount G.J., Ngo H. Minimal intervention: A new concept for operative dentistry. *Quintessence International* 2000;31(8):527-533
3. Bryant C.L. The Role of Air Abrasion in Preventing Early Pit and Fissure Caries. *J Can Dent Assoc* 1999;65:566-9
4. Milicich G. The Use of Air Abrasion and Glass Ionomer Cements in Microdentistry. *Compendium* 2001;22(11A):1026-38
5. Staehle H.J. Minimally Invasive Restorative Treatment. *The J of Adhesive Dentistry* 1999;1(3):267-284
6. Rainey J.T. Air abrasion: an emerging standard of care in conservative operative dentistry. *Dent Clin North Am.* 2002 Apr;46(2):185-209
7. Rainey J.T. Understanding the applications of microdentistry *Compend Contin Educ Dent.* 2001 Nov;22(11A):1018-25
8. Milicich G., Rainey J.T. Clinical presentations of stress distribution in teeth and the significance in operative dentistry. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 2000 Sep;12(7):695-700
9. Kutch K.V. Microdentistry: a new standard of care. *J Mass Dent Soc.* 1999 Winter; 47(4):35-9.
10. Rosenberg S. Air-abrasive microdentistry: a new perspective on restorative dentistry. *Dent Econ.* 1995 Sep;85(9):96-7
11. Berry E.A., Eakle W.S. Summitt J.B. Air abrasion: an old technology reborn. *Compend Contin Educ Dent.* 1999Aug; 20(8):751-4, 756, 758-9

3. místo

MUTAČNÍ ANALÝZA V GENU PRO APOPROTEIN B U ČESKÉ POPULACE OBÉZNÍCH DĚTÍ A OSOB S DIAGNÓZOU ISCHEMICKÉ CHOROBY SRDEČNÍ

Autoři: Helena Svobodová, Ivan Mazura, Michal Vrablík, Richard Češka
Školitel: Doc. MUDr. Richard Češka, CSc., III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF a VFN



Helena Svobodová

Úvod

Apoproteiny, bílkovinné složky lipoproteinových částic, jsou kofaktory enzymů účinných v lipoproteinovém metabolismu, zprostředkovávají vazbu lipoproteinové částice na specifické receptory, účastní se přenosu nebo výměny lipidových částic mezi jednotlivými lipoproteiny.

Apoprotein B (ApoB) je hlavním strukturálním apoproteinem LDL částic. Je ligandem LDL receptoru a zprostředkovává vychytávání LDL částic z plazmy. Mutace v genu pro ApoB mohou být spojeny se sníženou afinitou ApoB k LDL receptoru.

Inzerce / delece 3 aminokyselin Leucin-Alanin-Leucin v signálním peptidu genu pro ApoB může mít vliv na hladiny plazmatických lipidů. S alelou Ins jsou spojovány nízké hladiny cholesterolu a ApoB a vyšší hladiny triglyceridů oproti alele Del.

Přítomnost substituce cytozinu (C) thyminem (T) v promotoru genu pro ApoB v homozygotní formě (genotyp T/T) je asociována s vyššími hladinami ApoB a LDL cholesterolu oproti genotypům C/T a C/C.

Cíle studie

Cílem studie je stanovit frekvence polymorfizmu Inzerce / delece (Ins/Del) a polymorfizmu Substituce cytozinu thyminem (C-T) v genu pro apoprotein B u osob s ischemickou chorobou srdeční a s obezitou. Dalším záměrem je posoudit závislost studovaných genotypů na hladinách plazmatických lipidů.

Pacienti

Vyšetřili jsme soubor pacientů s ischemickou chorobou srdeční (ICHS) a dva soubory pacientů s obezitou (Obezita II a Obezita III). Soubor ICHS tvoří pacienti s ICHS, kteří byli přijati k provedení plánované koronární angioplastiky (PTCA). Soubory Obezita II a Obezita III sestávají z dětských pacientů s obezitou 2. a 3. stupně, kteří se zúčastnili léčebného pobytu zaměřeného na redukci hmotnosti v dětské léčebně.

Metody

Provedli jsme vyšetření lipidogramu zahrnující stanovení celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu, triglyceridů a apoproteinu B. Dále byl u pacientů na základě antropometrického vyšetření stanoven index tělesné hmotnosti Body Mass Index. Genetická analýza spočívala v izolaci DNA z leukocytů periferní krve, spektrofotometrickém zjištění koncentrace a čistoty DNA, amplifikaci DNA polymerázovou řetězovou reakcí. Elektroforetickou analýzu jsme použili k stanovení polymorfizmu Inzerce / delece. Restrikční analýzou jsme detekovali polymorfizmus Substituce cytozinu thyminem. Data byla statisticky zpracována pomocí Kruskalova-Wallisova testu, Mannova-Whitneyova U testu, λ^2 - testu, Fisherova faktoriálního testu.

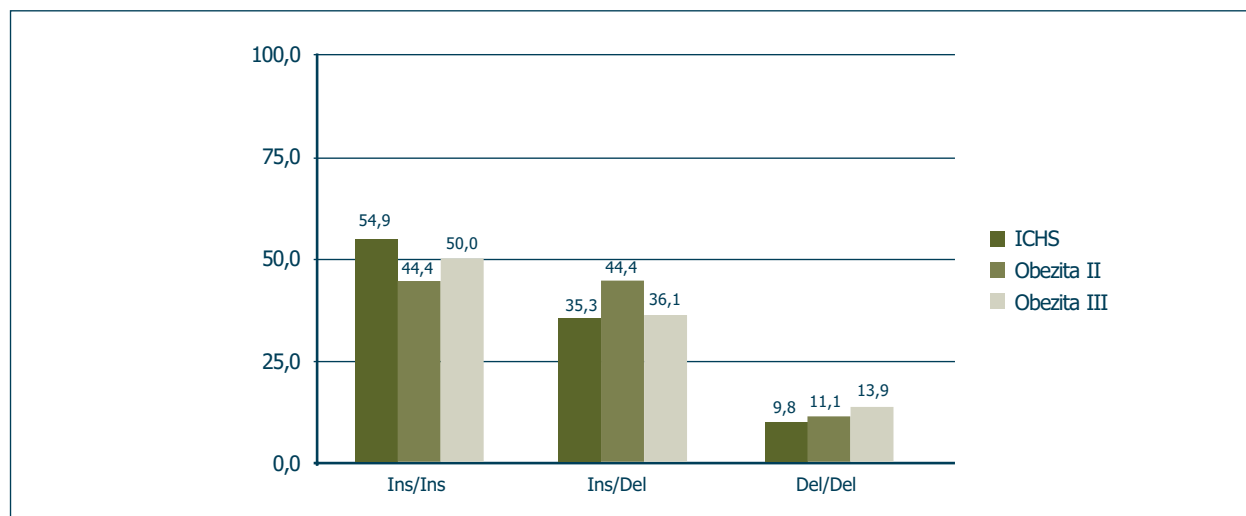
Výsledky

Pomocí uvedených metod jsme stanovili jednotlivé genotypy obou studovaných polymorfizmů. Tab. 1 popisuje základní charakteristiky souboru vyšetřených osob. Graf 1 ukazuje zastoupení frekvencí jednotlivých genotypů polymorfizmu Inzerce / delece. Z grafu 2 vyplývá, jaké jsou frekvence jednotlivých genotypů polymorfizmu Substituce cytozinu thyminem. Závislost studovaných genotypů na plazmatických hladinách lipidů nebyla prokázána.

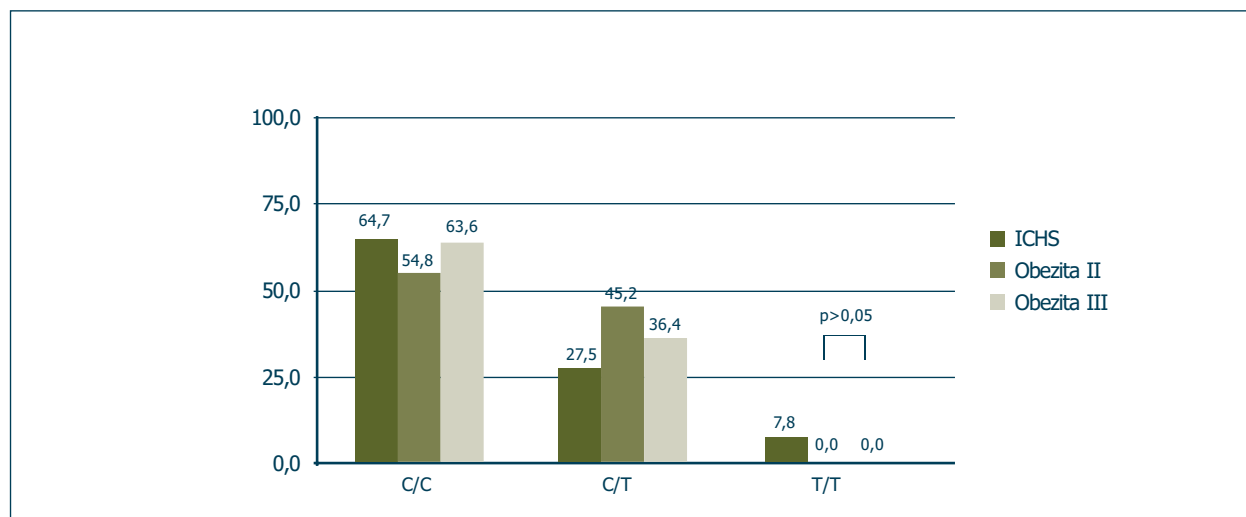
TAB. 1: ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY SOUBORU VYŠETŘENÝCH OSOB.

BMI - BODY MASS INDEX, TC – CELKOVÝ CHOLESTEROL, HDL – HDL CHOLESTEROL, LDL – LDL CHOLESTEROL, TG – TRIGLYCERIDY, APOB – APOPROTEIN B, N.D. – NENÍ K DISPOZICI.

	ICHS	Obezita II	Obezita III
počet	51	63	36
věk	59.5 ± 8.8	13.6 ± 2.5	12.7 ± 2.6
BMI	29.3 ± 4.0	30.8 ± 2.8	35.0 ± 4.5
TC [mmol/l]	4.5 ± 1.0	4.4 ± 0.8	4.5 ± 0.9
HDL [mmol/l]	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2
LDL [mmol/l]	2.6 ± 0.7	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.7
TG [mmol/l]	1.7 ± 0.9	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.4
ApoB [g/l]	n.d.	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.2



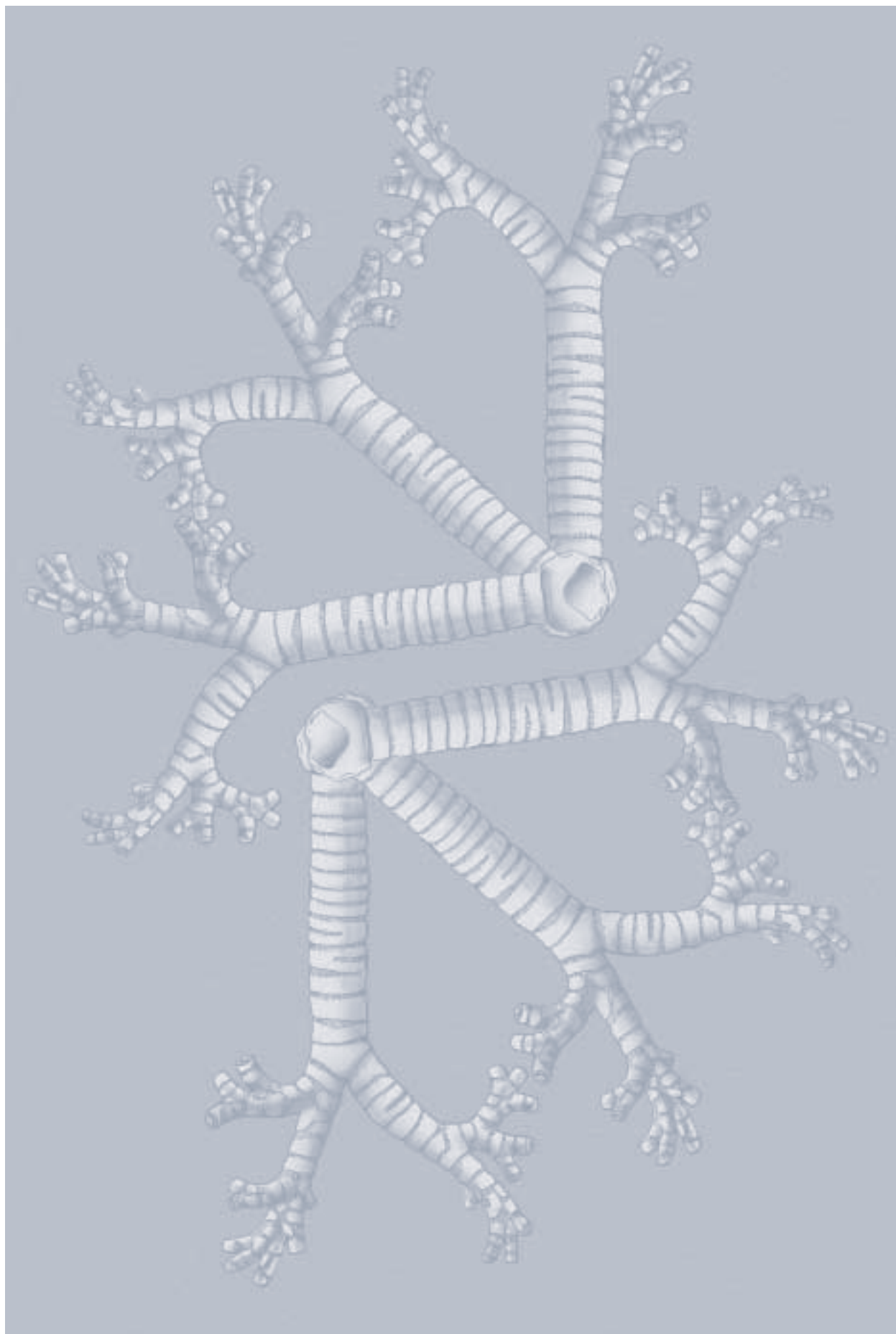
GRAF 1: FREKVENCE (V %) JEDNOTLIVÝCH GENOTYPŮ POLYMORFIZMU INZERCE / DELECE U OSOB S ICHS, OBEZITOU 2. A 3. STUPNĚ.



GRAF 1: FREKVENCE (V %) JEDNOTLIVÝCH GENOTYPŮ POLYMORFIZMU INZERCE / DELECE U OSOB S ICHS, OBEZITOU 2. A 3. STUPNĚ.

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA DĚKUJE SPONZORŮM KONFERENCE





CENA ZDRAVOTNICKÝCH NOVIN

Autor: Havránek Ondřej, 3.r.
Školitel: MUDr. Michal Zikán

Název práce: „Analýza mutace 3819del5 genu BRCA1
v české populaci“

ANALÝZA MUTACE 3819DEL5 GENU BRCA1 V ČESKÉ POPULACI

Autor: Ondřej Havránek (3. ročník)
Školitel: MUDr. Michal Zikán, Ústav biochemie a experimentální onkologie
1. LF



Ondřej Havránek

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen u nás, 5-10% vzniká na podkladě vrozené mutace. Asi 52 % mutací je přítomno v genu BRCA1, který je tak spolu s genem BRCA2 (32%) hlavním predispozičním genem. Mutace v tomto genu výrazně zvyšuje riziko karcinomu prsu, kolem 80% ve věku do 70 let, a karcinomu ovaria, 40-60% do 70 let. Cílem práce je zhodnotit četnost mutace 3819del5 genu BRCA1 v české populaci žen s karcinomem prsu vzhledem k diagnostice genetických dispozicí.

Testováno bylo 500 pacientek s karcinomem prsu a 300 zdravých lidí. DNA byla amplifikována pomocí PCR a mutace detekována elektroforézou v agarosovém gelu. Rozdíl délky normální a mutované alely se projevil vznikem dvou fragmentů.

V testovaném souboru 500 pacientek s karcinomem prsu byla nalezena jedna mutace, v kontrolním souboru 300 lidí nebyla nalezena žádná. Podíl mutace 3819del5 na vzniku nádoru v populaci žen s karcinomem prsu je tedy přibližně 1:500. Pro přesnější odhad by bylo nutné otestovat mnohem větší soubor pacientů. Podle jiné studie je výskyt mutace 3819del5 mezi ostatními v BRCA1 genu 14%. Z toho by se dalo usuzovat na četnost mutace 3819del5 1:300 v populaci žen s karcinomem prsu. Z nálezu mutace u zdravé ženy vyplývá nutnost preventivní péče s několika možnostmi zásahu. Od precizního sledování po preventivní mastektomii.

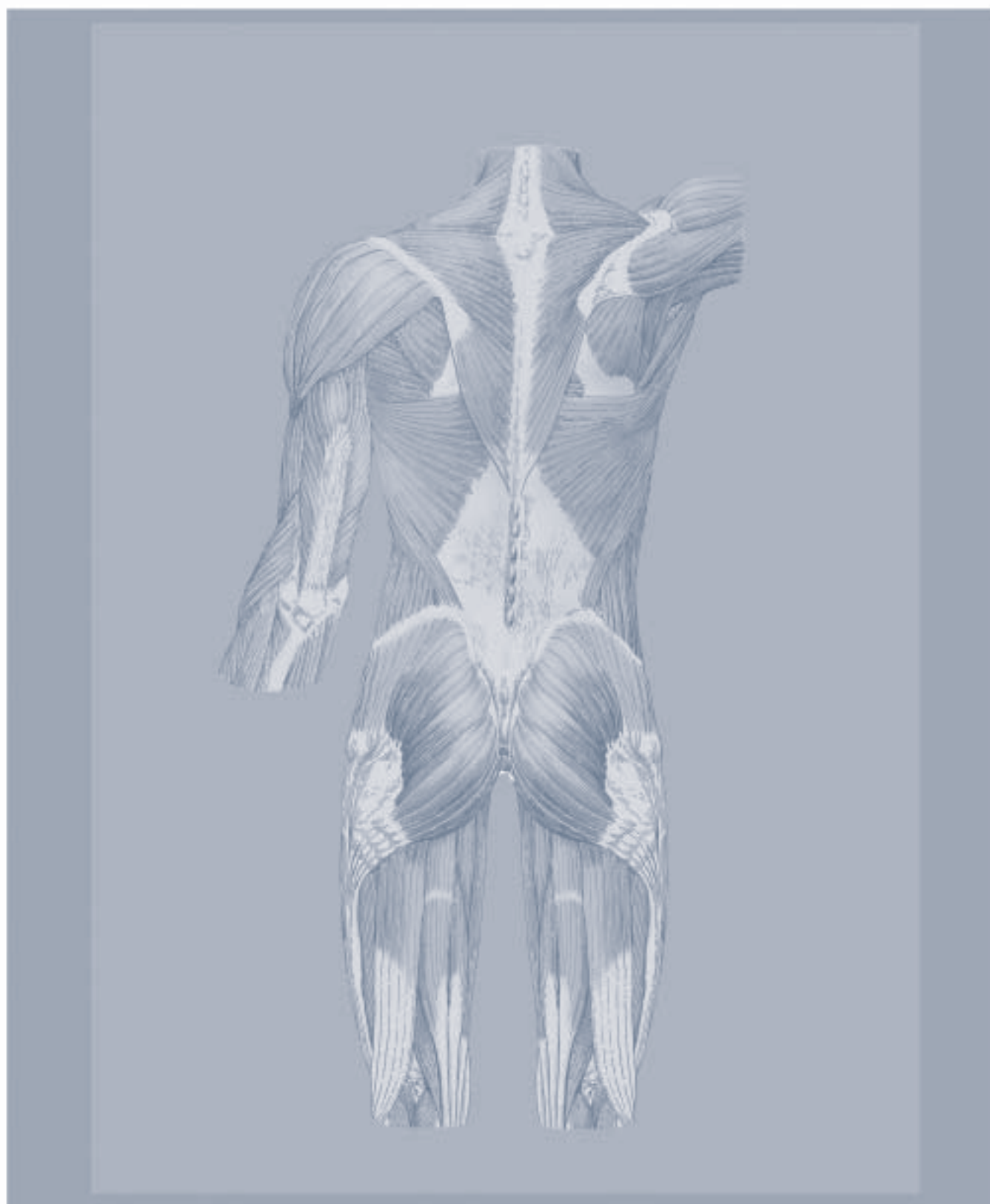
Mutace 3819del5 je v české populaci jednou z nejčastějších mutací genu BRCA1. Je nutné se zamyslet, jaký význam by mělo vyšetřování všech pacientek s karcinomem prsu na přítomnost této a dalších častých mutací genu BRCA1, které by v případě testování konkrétních mutací bylo velice levné. Podmínkou ovšem je dostatečné množství zachycených mutací.

Práce In Extenso viz strana 52



Zvláštní cenu Zdravotnických novin získal za svoji práci „Analýza mutace 3819del5 genu BRCA1 v české populaci“ Ondřej Havránek, student 3. ročníku, který soutěžil v sekci pregraduální – teoretické části.

5. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE



Zpracovalo Oddělení vnějších vztahů UK v Praze – 1. LF
Vydalo nakladatelství Galén, Na Bělidle 34, 150 00 Praha 5 jako účelovou publikaci 1. LF UK v Praze
Ilustrace, grafická úprava a návrh obálky ak. mal. Ivan Helekal
Fotografie Vladimír Brada (ZDN), Mgr. Karel Meister
Sazba Vojtěch Kočí, Galén
Tisk GLOS, Špidlenova 436, 513 01 Semily
ISBN 80-7262-289-7