

8. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE



Konaná dne 22. května 2007
pod záštitou děkana 1. LF UK
prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc., MBA



8. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE



Konaná dne 22. května 2007

pod záštitou děkana 1. LF UK
prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc., MBA

OBSAH

Slovo úvodem	3
Pozvánka	4
Seznam účastníků	6
Hodnotitelská komise.....	8
ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ	10
Sekce pregraduální – teoretická část.....	10
Sekce pregraduální – klinická část.....	16
Sekce postgraduální – přednášky	22
Sekce postgraduální – postery	34
Sekce nelékařská – ošetrovatelská	52
VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO	55
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST	58
Major platelet activation and inhibition pathways converge on regulation of VASP and 14-3-3 interaction – Pavel Říha.....	59
Signalizační změny u laboratorní myši vyvolané vyřazením genu c-fos – Jan Beneš.....	64
Funkčně genomická analýza definovaného úseku chromozomu 4 spontánně hypertenzního kmene potkana u dvou nových kongenních kmenů – Marie Morysová	67
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST	72
Průzkum používání mírné hypotermie u pacientů po srdeční zástavě na území ČR – Renáta Bartáková a Kateřina Matějů	73
Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s Cushingovým syndromem – Eva Horová	74
Texturní příznaky intimomediální tloušťky společné karotidy nemocných s primárním hyperaldosteronismem a esenciální hypertenzí – Bohumil Majtan	77
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY	82
Vliv buněk nádorového stromatu na fenotyp normálních lidských keratinocytů – MUDr. Lukáš Lacina	83
shRNA – mediated knockdown of human Oxa1l in HEK293 cells – Mgr. Lukáš Stibůrek	85
Jednoduchá a přesná metoda stanovení sérové koncentrace 7α -hydroxy-4-cholesten-3-onu, markeru malabsorpce žlučových kyselin – MUDr. Martin Leníček	86
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY	90
Využití RNA interference při studiu úlohy glykogenfosforylázy během encystace volně žijících améb rodu Acanthamoeba – MUDr. Jarmila Klieščíková	91
Feem analysis of temporomandibular joint – MUDr. Ing. Radek Jirman	94
Identifikace nových mutací v genu ZEB1 u českých a britských pacientů se zadní polymorfni dystrofií rohovky – Petra Lišková	102
SEKCE NELÉKAŘSKÁ – OŠETŘOVATELSKÁ	108
Kvalita života osob s afázií – psychosociální rovina a fázíí – Bc. Zuzana Vodehnalová	109
Kvalita života lidí s postupnou ztrátou zraku místo – Bc. Jana Novotná	112
Centra pro léčbu bolesti – Bc. Jana Holoubková, DiS.....	113
ZVLÁŠTNÍ CENY	116

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

dostává se Vám do rukou sborník již 8. ročníku studentské vědecké konference, konané na 1. lékařské fakultě UK.

Návrat k pořádání studentských vědeckých konferencí považuji za velmi pozitivní krok a pomoc našim studentům naučit se prezentovat svoje první výsledky vědecké práce. Budou to zase oni, kteří budou jednou na naši práci navazovat a rozvíjet ji.

Tradice vědeckých konferencí, která byla obnovena a její letošní konání jen potvrdilo, že tento krok pro podporu rozvoje tvůrčího potenciálu pregraduálních, postgraduálních a nově také studentů bakalářských oborů byl krokem správným. V akademickém roce 2006/2007 byla účast na studentské vědecké konferenci zařazena mezi volitelné předměty.

Letošní 8. ročník studentské vědecké konference byl mimořádný nejen počtem přihlášených prací – bylo jich celkem 87, ale také tím, že byl rozšířen o sekci nelékařskou – sekci bakalářských prací. Kvalita všech 87 prací, které byly do soutěže přihlášeny, byla i v letošním roce velmi dobrá. Byl bych velmi rád, kdyby se v budoucnu na těchto konferencích prezentovali více pregraduální studenti a získali tak jistotu pro prostředí vědeckých kongresů, kterých se budou v budoucnosti účastnit.

Bylo oceněno celkem 15 vítězných prací a 3 zvláštní ceny pro tři vybrané oceněné vítěze ještě navíc udělovaly redakce Medical Tribune, Zdravotnických novin a nakladatelství Galén. Jako každý rok i letos nejlepší vybrané práce postoupí do celostátního kola, které se bude konat na podzim 2007.

Dovolte mi, abych poděkoval za práci předsedům a všem členům hodnotících komisí a také pracovním oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky a oddělení vnějších vztahů 1. LF, které se na přípravě letošní studentské konference podílely.

Chci poděkovat firmám MSD, Schering-Plough, Sanofi Aventis, nakladatelství Galén, s.r.o., nakladatelství Grada Publishing a.s., redakci Medical Tribune a redakci Zdravotnických novin, které podpořily naši studentskou konferenci cenami pro nejlepší práce.

Zejména bych rád poděkoval všem učitelům, kteří se pregraduálním a postgraduálním studentům věnují po celý rok a zasvěcují je do krásy bádání a objevování nepoznaného. Objevování neznámého je touhou člověka od počátku jeho existence. Uvědomme si, že i malé objevy zapadají do mozaiky světového poznání a přispívají k obohacení lidského společenství.

Přeji všem studentům, kteří se zúčastní celostátního kola studentské vědecké konference mnoho úspěchů a nám všem, aby i budoucí ročníky studentské vědecké činnosti na naší 1. lékařské fakultě byly stejně tak úspěšné, jako byl ten letošní.

*prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA
děkan Univerzity Karlovy v Praze, 1. lékařské fakulty*



8. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE
1. lékařské fakulty
konaná pod záštitou děkana 1. LF
prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc., MBA
22. KVĚTNA 2007
Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

8. studentskou vědeckou konferenci zahájí děkan 1. lékařské fakulty prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA dne 22. května 2006 v 8.00 hodin ve Velké zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2.

Studentská vědecká konference bude uspořádána ve třech sekcích. Sekce postgraduálních prací, sekce pregraduálních prací a sekce nelékařských – ošetřovatelských prací.

SEKCE PREGRADUÁLNÍCH PRACÍ bude probíhat 22. května 2007 od 8.15 hodin v posluchárně Stomatologické kliniky 1. LF, Kateřinská 32, Praha 2.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍCH PRACÍ bude probíhat 22. května 2007 od 8.15 hodin ve Velké zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2.

Prezentace proběhne na základě hodnocení komise formou přednášky nebo posteru.

SEKCE OŠETŘOVATELSKÝCH PRACÍ bude probíhat 22. května 2007 od 8.15 hodin v seminární místnosti č. 123.

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 dvouprojekce a postery (rozměr 160×120 cm).

Účastníky konference žádáme, aby si přinesli svůj osobní notebook.
K pozvánce je přiložen časový harmonogram jednotlivých vystoupení.

prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc.
proděkan pro vědeckou činnost, akreditaci a evaluaci

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA
děkan Univerzity Karlovy, 1. lékařské fakulty

Veškeré informace o konání SVK:

Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky 1. LF

Karolína Havelková, tel.: 224 964 330

e-mail: karolina.havelkova@lf1.cuni.cz

Přijměte, prosím pozvání na slavnostní vyhlášení výsledků 8. studentské vědecké konference 1. LF, které se bude konat dne 14. 6. 2007 ve 14.30 hod. v Akademickém klubu 1. LF, Faustův dům, Karlovo nám. 40, Praha 2.

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc. MBA
děkan Univerzity Karlovy, 1. lékařské fakulty

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA DĚKUJE SPONZORŮM KONFERENCE



SEZNAM ÚČASTNÍKŮ

SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST

- Bartáková Renáta, 4. r.
- Matějů Kateřina, 4. r.
- Feltlová Eliška, 3. r.
- Kociánová Eva, 3. r.
- Pasteláková Blanka, 3. r.
- Horová Eva, 6. r.
- Janega Martin, 2. r.
- Majtan Bohumil, 6. r.
- Nováková Lenka, 5. r.
- Řeháček Adam, 2. r.
- Skáčilová Lucia, 6. r.
- Špeldová Andrea, 2. r.
- Telička Zdeněk, Bc., 1. r.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST

- Beneš Jan, 5. r.
- Fujáková Michaela, 5. r.
- Gáll Juraj, 6. r.
- Havlíčková Vendula, 5. r.
- Krupková Michaela, 5. r.
- Minks Jakub, 5. r.
- Mládková Nikol, 4. r.
- Morysová Marie, 4. r.
- Říha Pavel, 6. r.
- Šenkýřová Štěpánka, 4. r.
- Peticha Josef, 3. r.

SEKCE NELÉKAŘSKÝCH – OŠETŘOVATELSKÝCH PRACÍ

- Holoubková Jana, Bc. DiS., 2. r.
- Novotná Jana, Bc. 2. r.
- Vodehnalová Zuzana, 2. r.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY

- Dvořák Karel, MUDr., 1. r.
- Fornůstková Daniela, Mgr., 3. r.
- Glierová Hana, Mgr., 3. r.
- Homolová Kateřina, Ing., 3. r.
- Kalmárová Markéta, Mgr., 6. r.
- Krtil Jan, MUDr., 6. r.
- Lacina Lukáš, MUDr., 3. r.
- Leníček Martin, MUDr., 4. r.
- Linetskiy Igor, MUDr., 3. r.
- Majer Filip, Mgr., 3. r.
- Malínská Hana, Mgr., 5. r.
- Panigaj Martin, Mgr., 4. r.
- Pejznochová Martina, Mgr., 3. r.
- Procházková Jana, Mgr., 4. r.
- Spišáková Martina, Mgr., 5. r.
- Stibůrek Lukáš, Mgr., 4. r.
- Stránská Zuzana, MUDr., 2. r.
- Švarcová Jana, Mgr., 3. r.
- Ulbrichová Dana, Mgr., 4. r.
- Vlč Marek, MUDr., 3. r.
- Vojtová Lucie, Ing., 3. r.
- Záhoráková Daniela, Mgr., 5. r.
- Zanvit Petr, Mgr., 6. r.
- Zelenka Jaroslav, Ing., 3. r.

- Bálková Štěpánka, MUDr., 3. r.
- Beran Ondřej, MUDr., 5. r.
- Biroš Ernest, MUDr., 1. r.
- Burda Pavel, Mgr., 1. r.
- Bošanská Lenka, MUDr., 2. r.
- Čada Zdeněk, MUDr., 2. r.
- Červená Irena, MUDr., 3. r.
- Čížek Zdeněk, MUDr., 5. r.
- Duffková Ladislava, MUDr., 2. r.
- Dušek Petr, MUDr., 4. r.
- Fabiánová Jana, MUDr., 4. r.
- Fojtíková Markéta, MUDr., 2. r.
- Habara Petr, MUDr., 1. r.
- Havránková Petra, MUDr., 4. r.
- Hnízda Aleš, Ing., 1. r.
- Hrdý Jiří, 1. r.
- Jirman Radek, MUDr., Ing., 8. r.
- Kasperová Martina, MUDr., 3. r.
- Klieščiková Jarmila, MUDr., 2. r.
- Kmoch Vladimír, MUDr., 3. r.
- Kodydková Jana, Mgr., 1. r.
- Kopecká Jana, Ing., 1. r.
- Kopečková Marta, Mgr., 1. r.
- Králík Lubomír, Mgr., 1. r.
- Krupička Jan, MUDr., 2. r.
- Křenová Martina, Mgr., 5. r.
- Lišková Jana, Mgr., 7. r.
- Lišková Petra, MUDr., 7. r.
- Mráz Miloš, MUDr., 1. r.
- Oganessian Edgar, MUDr., 3. r.
- Roubíček Tomáš, MUDr., 1. r.
- Szakácsová Monika, 2. r.
- Špaček Miroslav, MUDr., 2. r.
- Štěpánková Lenka, MUDr., 2. r.
- Tajtlová Jana, Mgr., 2. r.
- Tuková Jana, MUDr., 2. r.
- Vargová Karina, Mgr., 1. r.
- Vávrová Lucie, Mgr., 1. r.
- Volná Jana, MUDr., 4. r.



HODNOTITELSKÉ KOMISE

PREGRADUÁLNÍ SEKCE

ČÁST TEORETICKÁ

předseda: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

člen: doc. MUDr. Zdeněk Susa, CSc.

ČÁST KLINICKÁ

předseda: prof. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc.

člen: prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.

ČÁST NELÉKAŘSKÁ – OŠETŘOVATELSKÁ

předseda: Mgr. Dana Jurásková, MBA

člen: doc. MUDr. Petr Bartůněk, CSc.

POSTGRADUÁLNÍ SEKCE

PŘEDNÁŠKY

předseda: prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.

členové: doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.

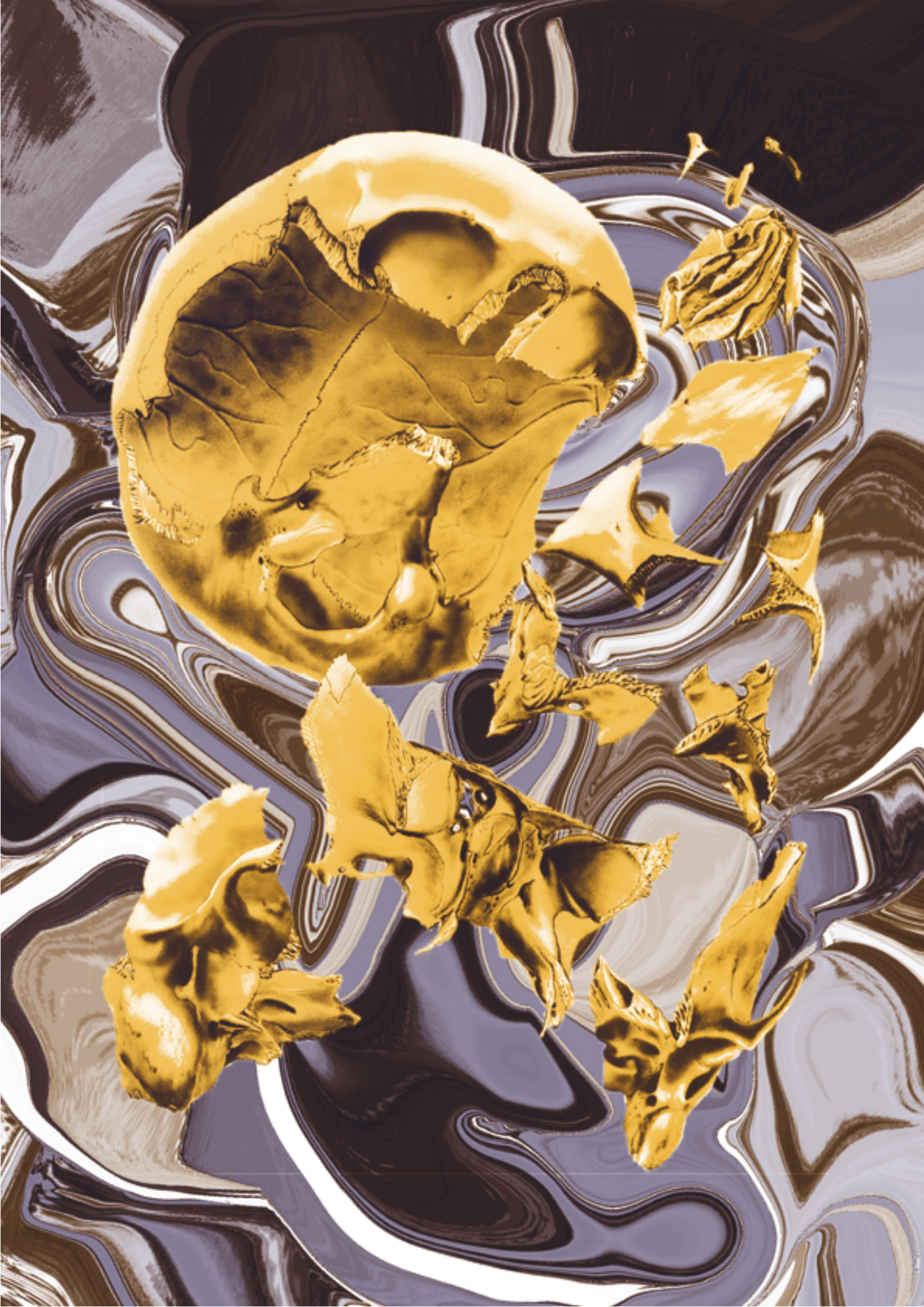
prof. MUDr. Rastislav Druga, DrSc.

POSTERY

předseda: prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.

členové: doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.

doc. MUDr. Pavel Maruna, CSc.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ TEORETICKÁ

ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST

- Beneš Jan, 5. r.
- Fujáková Michaela, 5. r.
- Gáll Juraj, 6. r.
- Havlíčková Vendula, 5. r.
- Krupková Michaela, 5. r.
- Minks Jakub, 5. r.
- Mládková Nikol, 4. r.
- Morysová Marie, 4. r.
- Peticha Josef, 3. r.
- Říha Pavel, 6. r.
- Šenkýřová Štěpánka, 4. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

předseda: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

člen: doc. MUDr. Zdeněk Susa, CSc.

**SIGNALIZAČNÍ ZMĚNY U LABORATORNÍ MYŠI VYVOLANÉ VYŘAZENÍM GENU C-FOS****Autor:** Jan Beneš, 5. roč.**Školitel:** doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D., Fyziologický ústav 1. LF UK

C-fos je považován za jednoho z nejvýznamnějších účastníků nitrobuňkové signalizace. Proto také hypotéza, kterou jsme zvolili pro predikci změn, které v nitrobuňkové signalizaci nastanou po jeho vyřazení (bráno u laboratorní myši), předpokládala, že tak zásadní změna v signalizaci nebude zpětně vést ke změnám v hustotě receptorů ani v centrálním nervovém systému (CNS: kortex a mozeček) ani v periférii (plíce, srdce). Sledovali jsme vliv vyřazení genu c-fos na vazebné charakteristiky vybraných receptorů, které jsou spřaženy s G-proteiny. Studovány byly následující receptory: α_1 -adrenoreceptory (AAR), β -adrenoreceptory (BAR), muskarinové receptory (MR), D_1 -like dopaminové receptory (D_1R), D_2 -like dopaminové receptory (D_2R). Vazebné vlastnosti muskarinových receptorů, dopaminových receptorů a adrenoreceptorů (α -adrenoreceptorů, β -adrenoreceptorů) byly zkoumány za použití vazby radioligandu 3H -QNB (pro muskarinové receptory), 3H -SCH23390 (pro D_1 -like dopaminové receptory), 3H -spiperonu (pro D_2 -like dopaminové receptory), 3H -prazosinu (pro α_1 -adrenoreceptory) a 3H -CGP 12177 (pro β -adrenoreceptory). Aktivita fosfolipázy C se měřila pomocí enzymatického stanovení měřením vzniklého radioaktivně značeného 3H -inositoltrisfosfátu za použití substrátu 3H -fosfatidylinositolbisfosfátu.

Zcela v protikladu k navrhované hypotéze jsme pozorovali významné změny v receptorové hustotě a to jak v periférii tak i v CNS. Jak hustoty MR tak i BAR byly v srdci a v plicích výrazně zvýšeny. V CNS se efekt vyřazení genu c-fos projevil selektivněji. Obecně vzato, receptory, které aktivovaly signální dráhu vedoucí přes Gq-protein, fosfolipázu C a proteinkinázu C (AAR, MR) byly ovlivněny, zatímco ostatní (které aktivují nebo inhibují adenylycyklázu: BAR, D_1R , D_2R) ovlivněny nebyly. Zcela v protikladu k receptorovým hustotám byla aktivita fosfolipázy C v mozečku snížena. Tyto výsledky naznačují, že vyřazení genu c-fos výrazným způsobem ovlivňuje nejenom hustotu receptorů, ale i využití jednotlivých signálních drah a interakci mezi nimi. Tyto mechanismy mohou být chápány jako jeden z adaptačních mechanismů, kterými se organismus vyrovnává s tak výrazným zásahem do signalizace, kterým vyřazení genu c-fos bezesporu je.

VLIV SYNTETICKÉ DROGY 2C-B (4-BROMO-2,5-DIMETOXYFENYLETYLAMIN) NA EEG SPEKTRA A EEG KOHEREKCE U POTKANA – POTENCIÁLNÍ MODEL PSYCHÓZY?**Autoři:** Michaela Fujáková, 5.roč., Tomáš Páleníček**Školitel:** MUDr. Tomáš Páleníček, Psychiatrické centrum Praha

Úvod: U nemocných schizofrenií byly zjištěny různé abnormality v elektroencefalografickém záznamu (EEG) v závislosti na převaze pozitivní či negativní symptomatologie. 2C-B (4-bromo-2,5-dimetoxyfenyletylamin) je syntetická halucinogenní droga s předpokládaným agonistickým účinkem na serotoninových receptorech (5-HT R) (Acuna-Castillo et al., 2002; Bronson et al., 1995; Glennon et al., 1980; Glennon et al., 1992; Lobos et al., 1992; Nichols 2004; Parrish et al., 2005; Villalobos et al., 2004). U lidí v závislosti na dávce vyvolává v nižších dávkách euforii, ve vysokých dávkách pak zřetelné psychedelické účinky jako halucinace, stavy depersonalizace, derealizace (Shulgin et al., 1991; Shulgin et al., 1975) a psychické změny, které jsou podobné akutnímu psychotickému procesu (Nichols 2004; Vollenweider 1998). V naší práci jsme se rozhodli zkoumat vliv 2C-B na změny v EEG spektrech a koherencích u potkana a posoudit potenciální přínos této metody jako modelu psychotického procesu.

Metodika: Samci potkanů kmene Wistar o hmotnosti 250 – 300g byly sedm dní před registrací EEG podrobeni v celkové halotanové anestézii stereotaktické implantaci 14 stříbrných elektrod. Den před registrací EEG byly zvířatům opět v krátkodobé (10-15 min) celkové halotanové anestezii přicementovány redukce / konektory pro připojení k EEG soupravě. EEG bylo registrováno po dobu 70 min, v prvních 10. minutách byl registrován klidový záznam, následně byla aplikována látka 2C-B (10 nebo 50 mg/kg s.c.). Po celou dobu registrace se zvířata mohla volně pohybovat ve své kleci. Pro analýzu EEG záznamu byl použit software Neuroguide.

Výsledky: V rámci spektrální analýzy obě dávky 2C-B 10 mg/kg i 50 mg/kg signifikantně zvýšily hodnoty spekter v delta i theta pásmu a současně snížily spektrální hodnoty v pásmu beta. Dávka 2C-B 10 mg/kg zvýšila bilaterálně fronto-temporální koherence v delta pásmu a současně vedla ke snížení koherencí (diskonekci) temporo-temporální v beta 3 pásmu. Dávka 2C-B 50 mg/kg zvýšila EEG koherence frontoparietálně v theta pásmu a současně opět vedla k diskonekci temporo-temporální tentokrát však v celém beta pásmu, zejména pak beta 1 a beta 2.

Závěr: Vzhledem k předpokládanému hlavnímu vlivu 2C-B je pravděpodobné že pozorované změny jsou následkem aktivace těchto receptorů s následnou modulací kortikálních excitačních a inhibičních rytmů (Acuna-Castillo et al., 2002; Bronson et al., 1995; Glennon et al., 1980; Glennon et al., 1992; Lobos et al., 1992; Nichols 2004; Parrish et al., 2005; Villalobos et al., 2004). Přesto že změny v sledovaných EEG parametrech nebyly zcela identické s daty zjištěnými u schizofrenních pacientů, vykazuje tento model určité podobnosti, které nám mohou pomoci více porozumět některým psychotickým procesům jako jsou například halucinace či bludy.

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZČR NR-8785-3 a MŠMT ČR 1M0002375201

ŽELEZO OTEVÍRÁ MITOCHONDRIÁLNÍ „MEGAKANÁL“ POUZE JE-LI IMPORTOVÁNO DO MATRIX MITOCHONDRIE

Autoři: Juraj Gáll, 6. roč., Jan Škrha, Eva Sedláčková, Karina Verébová, Richard, Buchal, Jan Pláteník
Školitel: MUDr. Jan Pláteník, PhD., Ústav lékařské biochemie 1. LF UK

Otevření „megakanálu“ ve vnitřní mitochondriální membráně (mitochondrial permeability transition, MPT) hraje významnou úlohu v mechanismu nekrotické i apoptotické smrti buněk. Hlavním induktorem tohoto fenoménu je kalcium, uplatnit se může i oxidační stres, v podmínkách organismu prakticky vždy katalyzovaný ionty přechodných kovů (Fe, Cu). V této práci studujeme vliv mikromolárního železa na indukci MPT v mitochondriích izolovaných z krysích jater. Mitochondrie jsou energizovány substráty, buď sukcinátem nebo malát/pyruvát a stimulovány přidávkou Ca^{2+} nebo Fe^{2+} . Měříme jejich bobtnání (pokles rozptylu světla), potenciál vnitřní membrány (pomocí fluorescenční sondy JC-1), stav oxidace purinových nukleotidů (fluorescence 340 nm/465 nm) a uvolnění cytochromu c (Western blotting). S oběma substráty působí Ca^{2+} i Fe^{2+} depolarizaci s bobtnáním inhibovatelnou cyklosporinem A (MPT). Bylo popsáno, že Fe^{2+} působí MPT přes zatížení antioxidační ochrany vedoucí ke změně poměru NADH/NAD⁺ směrem k oxidaci. Tomu odpovídá vyšší účinnost Fe^{2+} se sukcinátem (substrát pro komplex II) než s malát/pyruvát (poskytují NADH pro komplex I). Je-li ale k mitochondriím respirujícím na sukcinátu přidán rotenon (inhibitor komplexu I, zvyšuje NADH), případně ještě acetacetát (kompletně oxiduje NADH) nebo 3OH-butyát (naopak udržuje redukovanou formu NAD⁺), má to na Fe^{2+} indukované změny potenciálu a bobtnání malý nebo žádný vliv. Účinek Fe^{2+} na potenciál a bobtnání, ale nikoliv na oxidaci NADH, je kompletně inhibován chelátory jako EDTA nebo EGTA (výsledný komplex neproniká přes membrány), a také rutheniovou červení (klasický inhibitor kalciového uniportu). Je-li potenciál vnitřní mitochondriální membrány zrušen pomocí FCCP (zkratuje protonový gradient) a pak teprve přidáme Fe^{2+} , bobtnání nenastane. Z toho vyvozujeme, že Fe^{2+} musí být nejprve importováno do matrix mitochondrie, zřejmě kalciovým uniportem závislým na potenciálu vnitřní membrány, aby mohlo indukovat MPT. Oxidaci pyridinových nukleotidů může Fe^{2+} způsobit i zvenku, ale přinejmenším v našem experimentálním uspořádání to nemá zásadní význam pro indukci MPT. Popsané účinky Fe^{2+} se mohou účastnit patogeneze jaterního poškození při všech stavech selhávání sekvestrace cytosolového železa (př. hemochromatóza, alkoholická nemoc jater).

ANALÝZA FARMAKOGENETICKÉ A TERATOGENETICKÉ INTERAKCE KYSELINY RETINOVÉ S MUTACÍ LX U EXPERIMENTÁLNÍCH MODELŮ POLYDAKTYLIE-LUXACE A METABOLICKÉHO SYNDROMU

Autoři: Michaela Krupková, 5. roč., Michaela Janků, František Liška, Drahomíra Křenová, Lucie Šedová, Vladimír Křen, Ondřej Šeda
Školitelé: prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc., MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D., Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Mutantní gen Lx je odpovědný za syndrom polydaktylie-luxace u polydaktylního kmene potkana PD/Cub a jeho hlavním projevem je preaxiální polydaktylie zadních končetin. Kandidátním genem pro mutaci Lx potkana, je traskripční faktor Plzf. Tento gen jsme sledovali ve třech úrovních: 1. komparativní analýza DNA sekvence u PD/Cub a normodaktylních kmenů; 2. interakce Plzf s teratogenním působením kyseliny retinové (RA); 3. interakce Plzf s účinkem RA na aspekty metabolického syndromu.

Materiál a metody: Byl použit kongenní kmen SHR.Lx PD5, který obsahuje na 1,4 Mb úseku chromozomu 8 pouze 14 genů dárcovského kmene PD/Cub (včetně mutantní alely Plzf). Teratologické experimenty zahrnovaly aplikaci RA v dávce 50 mg/kg 13.-16. den gravidity samicím homozygotním nebo heterozygotním v mutantním Plzf. Odebrané féty byly diferenciatně barveny na kost a chrupavku a podrobeny morfometrické analýze malformací. Při metabolickém pokusu byla RA aplikována dospělým samcům SHR.Lx a SHR každodenně v dávce 15 mg/kg po dobu 17 dnů a změny metabolických parametrů (OGTT, lipidový profil) byly vyhodnocovány v několika časových intervalech.

Výsledky: Zvyšování dávky mutantní alely Lx vede ke zvýšení frekvence i míry postižení končetin teratogenními účinky RA a tato interakce je navíc stadiově specifická. V metabolickém pokusu jsme pozorovali výrazný rozdíl v efektu RA u SHR a SHR.Lx.

Závěr: Prokázali jsme interakci RA s mutací Lx jak na teratologické, tak metabolické úrovni.

THE ROLE OF REGULATOR OF CHROMOSOME CONDENSATION 1 IN MITOTIC AND POST-MITOTIC CELLS

Authors: Nikol Mladkova, Kiyomasa Nishii, M.D., Ph.D
Supervisor: Kiyomasa Nishii, M.D., Ph.D, Tokyo medical and Dental University, Dep. of Cell Biology

Objective: We performed series of experiments to monitor morphological and functional changes in Murine Embryonic Fibroblasts and Murine neurons due to Regulator of Chromosome Condensation (Rcc1) allele knock-out.

Introduction: RCC 1 is a guanine nucleotide exchange factor for the nuclear binding Gprotein Ran playing a central role in nucleocytoplasmic transport through the nuclear envelope. It regulates the function of proteins which facilitate the import to the nucleus or export to the cytoplasm. Ran is essential in nuclear transport and also for spindle assembly,



chromosome alignment and nuclear envelope formation. Its role might be important in both mitotic and post-mitotic cells.

Methods: Murine Embryonic Fibroblasts (MEFs) were cultured for two and nine days. First half of the culture had adenovirus added and the second part underwent a temperature change from 33,5 C to 37,0 C. A temperature-sensitive loss of Rcl was induced and analysed using phase-contrast image and protein electrophoresis (SDS PAGE). Neurons were cultured at 37 degrees centigrade for 5 days and stained with adenovirus analysed using phase-contrast image and adenovirus labelling.

Results: After two days of culturing no obvious change occurred in any of the MEF cultures. However after 9 days of culturing the approximate cell number seemed to be significantly lowered in virus-transfected cultures. SDS PAGE showed significant cell amount in both virus-transfected and virus-free cultures. Apparent morphological changes were not present. Neuronal cultures did not undergo changes in cell morphology and this might be due to the long half-time of Rec 1.

Conclusions: Rec 1 mutation might cause metabolic or/and morphological changes in variety of cell types. In accordance with our results, Rec 1 is present in neuronal cells, and may play an important role in control of apoptosis. Due to the longer than expected half-time of Rec 1, more time might be needed for observance of changes in morphology of neuronal cells.

FUNKČNĚ GENOMICKÁ ANALÝZA DEFINOVANÉHO ÚSEKU CHROMOZOMU 4 SPONTÁLNĚ HYPERTENZNÍHO KMENE POTKANA U DVOU NOVÝCH KONGENNÍCH KMENŮ

Autoři: Marie Morysová, 3.roč., M. Janků, L. Šedová, D. Křenová, F. Liška, P. Hamet, V. Křen, O. Šeda
Školitel: odb. as. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D., Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Geneticky definované zvířecí modely představují významný nástroj pro výzkum multifaktoriálních onemocnění včetně stavů spjatých s porušenou glukózovou tolerancí a dyslipidemií. V naší studii jsme posuzovali vliv specifického úseku genomu na metabolický a transkriptomický profil dvou nově vytvořených kongenních kmenů.

Metody: U 2 nových kongenních kmenů potkana (PD.SHR4/D4Rat7 a PD.SHR4/Il6-Cd36) bylo přenesením různých dlouhých úseků chromozomu 4 spontánně hypertenzního (SHR) kmene potkana na pozadí genomu polydaktylního (PD) kmene potkana dosaženo kombinace genetické výbavy dvou zavedených modelů metabolického syndromu. Rozsah diferenciálních segmentů jsme určili pomocí sady polymorfních mikrosatelitních markerů. U dospělých samců obou kongenních kmenů a kmene PD, krmených standardní dietou, byl proveden orální glukózový toleranční test, stanovena hladina inzulinu, volných mastných kyselin, adiponektinu, lipidemických parametrů a stanoven morfometrický a transkriptomický profil (Affymetrix Exon array, játra).

Výsledky: Diferenciální segmenty SHR původu byly vymezeny markery D4Rat139-D4Rat222 (160Mbp) a D4Rat248-D4Rat151 (29Mbp) u jednotlivých kongenních kmenů. Pozorovali jsme signifikantní rozdíly mezi kmeny v několika sledovaných parametrech – např. lačná glykémie a inzulinémie jsou u kmene PD vyšší než u obou kongenních kmenů, naopak hladina LDL cholesterolu u kmene PD.SHR4/D4Rat7 výrazně převýšila hodnoty zbývajících 2 kmenů. Identifikovali jsme rovněž skupinu diferenciálně exprimovaných transkriptů.

Závěr: Ustavili jsme 2 nové kongenní modely pro funkčně genomickou analýzu metabolického syndromu.

ZMĚNY V DOPAMINERGNÍ TRANSMISI U MYŠÍ S OLIVOCEREBELLÁRNÍ DEGENERACÍ

Autor: Josef Pleticha, 3. roč.
Školitel: doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D., Fyziologický ústav 1. LF UK

Mutantní myši typu Lurcher jsou postiženy funkční mutací &2 glutamátových receptorů, které jsou exprimovány především v Purkyňových buňkách a hrají klíčovou úlohu v mozečkových funkcích. Tyto myši jsou postiženy ataxií a mají sníženou schopnost motorického učení. Cílem této práce bylo objasnit změny v dopaminerním systému způsobené touto mutací u mutantů C57Bl a C3H Lurcher. Proto jsme studovali jednak behaviorální účinek (prostorové učení v Morrisově vodním bludišti) aktivace a inhibice D1 dopaminerních receptorem a jednak změny v D1-like a D2-like dopaminerních receptorech ve striatu, mozečku a hippocampu (vazebnými pokusy s 3_{H-SCH} 23390 (specifický ligand pro D1-like dopaminové receptory) a 3_{H-sp} iperonem (specifický ligand pro D2-like dopaminové receptory). Zjistili jsme, že mutantní myši vykazují zhoršené prostorové učení, ale oba typy myši reagovaly shodně na podání agonisty (beze změny) a antagonisty (zhoršení) D1-dopaminerních receptorem. V hippocampu byla u kmene C57Bl nalezena zvýšená denzita obou typů receptorem (o 288% u D1-like a o 411% u D2-like skupiny), zatímco u kmene C3H pouze D1-like skupiny (o 143%). V mozečku byla u kmene C57Bl denzita D1-like dopaminerních receptorů snížena (o 66%), zatímco denzita D2-like nezměněna. Ve striatu byly hodnoty obou typů receptorů nezměněny. Tyto výsledky naznačují specifickou úlohu dopaminerního receptorového systému při adaptaci na olivocerebellární degeneraci.

MAJOR PLATELET ACTIVATION AND INHIBITION PATHWAYS CONVERGE ON REGULATION OF VASP AND 14-3-3 INTERACTION

Author: Pavel Říha 6. roč.

Supervisor: Priv. - Doz. Dr. med. Albert Smolenski Institute of Biochemistry II, University of Frankfurt Medical School, Frankfurt am Main, Germany

Platelets are discoid anuclear cell fragments involved in cellular mechanisms of blood clot formation. ADP and thrombin induced platelet shape change is a crucial part of platelet adhesion, activation and aggregation. Platelet shape change is mediated by rapid reorganization of platelet cytoskeleton as actin filaments are uncapped and rebuilt. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is a multifunctional organizer of actin polymerization and formation of filopodia. Endothelium-derived nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) trigger VASP phosphorylation in platelets. Phosphorylated VASP induces F-actin barbed ends capping resulting in inhibition of actin filament assembly and platelet shape change. 14-3-3 proteins bind phosphoserine or phosphothreonine motifs specifically and thus modulate enzymatic activity, localization or interaction of target phosphoproteins. In order to yield further insights into the regulation of platelet shape change, we investigated interaction of VASP with 14-3-3 proteins. 14-3-3 proteins (beta and zeta isoforms) were identified as new binding partners of VASP. The VASP/14-3-3 interaction was tested by pull-down assays as well as co-immunoprecipitations in transfected cells. The binding of 14-3-3 to endogenous VASP was verified in platelet lysates. The VASP/14-3-3 binding site was mapped by mutational analysis of VASP. Platelet activation by ADP or thrombin increases 14-3-3 binding to VASP. Conversely, inhibition of platelets by NO and PGI₂ disrupts VASP/14-3-3 binding. These results indicate that the regulation of VASP/14-3-3 binding is a novel intersection of major platelet activation and inhibition pathways and define a new mechanism that might contribute to endothelial inhibition of platelet adhesion and aggregation.

NUTRIGENETICKÁ ANALÝZA VLIVU KONTINUÁLNÍHO A DISKONTINUÁLNÍHO PODÁVÁNÍ VYSOKOSACHARÓZOVÉ DIETY

Autoři: Štěpánka Šenkýřová, 4. roč., Drahomíra Křenová, Lucie Šedová, Ludmila Kazdová, Vladimír Křen, Ondřej Šeda

Školitelé: odb. as. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D., Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Nutrigenetika se zabývá vztahem mezi genetickou výbavou jedince a jeho odpovědí na kvalitativní a kvantitativní parametry přijímané potravy. Při modelování těchto komplexních vztahů se s výhodou používají geneticky definované modely.

Materiál a metody: Porovnávali jsme vliv osmítýdenního kontinuálního a diskontinuálního (3 následující dny v týdnu) podávání vysokosacharóзовé diety na metabolické a morfometrické parametry u dospělých samců dvojice kmenů laboratorního potkana, inbredního kmene Brown Norway (n = 22) a kongenního kmene BN-Lx (n = 23), který nese diferenciální segment 8. chromozómu původem od modelu metabolického syndromu, polydaktylního kmene potkana PD/Cub.

Výsledky: Analýza rozptylu pro 2 faktory (kmen, dieta) ukázala významnou interakci pro toleranci glukózy (p=0,0003), relativní hmotnost srdce (p=0,0002), jater (p<0,0001), ledvin (p=0,005), epididymálního (p=0,02) a retroperitoneálního tuku (p=0,002). Oproti publikované akcentaci intolerance glukózy po krátkodobé sacharóзовé dietě jsme u kmene BN-Lx trend, kdy ve srovnání s kmenem BN/Cub byla reziduální plocha pod glykemickou křivkou vyšší na standardní dietě, nelišila se na kontinuální sacharóзовé dietě a byla nižší na diskontinuální sacharóзовé dietě.

Závěr: Identifikovali jsme specifickou úlohu oblasti chromozómu 8 potkana v interakci s dietami s vyšším obsahem sacharózy. Tyto výsledky poukazují na nutnost zahrnutí časových charakteristik do interpretace nutrigenetických interakcí.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ KLINICKÁ

ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST

- Bartáková Renáta 4. r.
- Horová Eva, 6. r.
- Janega Martin, 2. r.
- Majtan Bohumil, 6. r.
- Nováková Lenka, 5. r.
- Řeháček Adam, 2. r.
- Skáčiková Lucia, 6. r.
- Špeldová Andrea, 2. r.
- Telička Zdeněk, Bc., 1. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

předseda: prof. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc.

člen: doc. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.



PRŮZKUM POUŽÍVÁNÍ MÍRNÉ HYPOTERMIE U PACIENTŮ PO SRDEČNÍ ZÁSTAVĚ NA ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY

Autorky: Renáta Bartáková, 4. roč., Matějí Kateřina, 4. roč.

Školitel: MUDr. Roman Škulec, II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Jedním z rizik prodělané srdeční zástavy je nevratné poškození centrálního nervového systému. Indukce mírné hypotermie (MH) u nemocných po srdeční zástavě co nejdříve po obnovení spontánní cirkulace (ROSC) je jediný známý postup, který toto riziko snižuje. Přestože je metoda MH již součástí doporučení pro kardiopulmonální resuscitaci, literární údaje svědčí o tom, že je používána nedostatečně. V západní Evropě a USA ji aplikuje pouze 13–28% jednotek intenzivní péče. Jaký je stav používání této metody v České republice není známé.

Cíl: Zjistit, jak často a jakým způsobem je terapeutická MH u nemocných po srdeční zástavě používána v České republice.

Metoda: Na základě analýzy seznamu nemocnic a veřejných internetových zdrojů jsme sestavili seznam všech jednotek intenzivní péče v České republice. Tyto jsme obeslali v období od prosince 2006 do března 2007 strukturovaným dotazníkem sestávajícím z 23 otázek. Získané odpovědi jsme zpracovali základní statistickou analýzou.

Výsledky: Obeslali jsme 594 jednotek intenzivní péče, response byla 31%. Pacienty po srdeční zástavě pravidelně ošetřuje 63,4% všech respondentů (116 pracovišť). Z nich použilo metodu MH u nemocných po srdeční zástavě alespoň jednou 57 pracovišť (49,1% ze všech respondentů, kteří pečují o nemocné po srdeční zástavě). Nejčastějším důvodem nepoužívání metody byl nedostatek informací o metodě a fakt, že metoda není zpracována českými doporučeními. Náplní ústního sdělení budou i další podrobné procedurální údaje o používání metody.

Závěr: Z analyzovaného souboru respondentů vyplývá, že metodu terapeutické mírné hypotermie po srdeční zástavě používá v České republice pouze 49,1% jednotek intenzivní péče pečujících o nemocné po srdeční zástavě. K dalšímu rozšíření metody by pravděpodobně přispěla větší informovanost odborné veřejnosti a implementace této terapeutické metody do doporučení o péči o nemocné po srdeční zástavě.

MIKROVASKULÁRNÍ REAKTIVITA U PACIENTŮ S CUSHINGOVÝM SYNDROMEM

Autorka: Eva Horová, 6. roč.

Školitel: Martin Prázný, Jana Ježková, Viktorie Lazárová, Václav Hána, Jan Kvasnička, Ladislav Pecan, Josef Marek, Jan Škrha, Michal Kršek, as. MUDr. Martin Prázný, CSc., PhD., III. interní klinika- klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Cíl práce: Cushingův syndrom je vzácné endokrinní onemocnění spojené s endogenní nadprodukcí kortizolu. Cílem studie bylo vyšetření mikrovaskulární reaktivity u pacientů s Cushingovým syndromem s přihlédnutím k přítomnosti diabetu a arteriální hypertenze.

Metody: Do studie bylo zařazeno celkem 29 pacientů s aktivním Cushingovým syndromem a 16 zdravých osob, které sloužily jako kontrolní skupina. K měření kožní mikrovaskulární reaktivity na předloktí byla použita metoda laser-doppler. Byly provedeny stimulační testy s ischemií (post-okluzivní reaktivní hyperémie – PORH) a se zahřátím na 44 °C (termální hyperémie – TH), při kterých byla měřena maximální perfúze a rychlost vzestupu perfúze. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD.

Výsledky: Pacienti s diabetes mellitus a arteriální hypertenzí měli výrazně nižší maximální perfúzi při PORH než pacienti normotenzní bez diabetu a také než kontrolní skupina ($33,8 \pm 14,9$ vs. $70,2 \pm 30,9$ PU, $p < 0,01$ a $64,2 \pm 25,0$ PU, $p < 0,005$) a podobně byly nižší hodnoty maximální perfúze při TH ($87,4 \pm 41,7$ vs. $197,2 \pm 112,2$ PU, $p < 0,01$ a $171,6 \pm 68,1$ PU, $p < 0,005$). U pacientů s diabetem a hypertenzí byly sníženy i hodnoty rychlosti vzestupu perfúze při PORH a TH ve srovnání s pacienty bez těchto komplikací ($3,0 \pm 1,8$ vs. $6,8 \pm 3,4$ PU/s, $p < 0,02$ a $1,0 \pm 0,8$ vs. $2,3 \pm 1,1$ PU/s, $p < 0,03$). Mezi pacienty bez přidružených komplikací (bez diabetu a hypertenze) a kontrolní skupinou nebyl zjištěn v mikrovaskulární reaktivitě statisticky významný rozdíl.

Závěr: Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s Cushingovým syndromem je nejvíce ovlivněna hodnotami krevního tlaku. Pacienti s kombinací arteriální hypertenze a diabetes mellitus měli nejvíce vyjádřenou poruchu mikrovaskulární reaktivity. Intenzivnější léčba diabetu a arteriální hypertenze by mohla snížit výskyt cévních komplikací a kardiovaskulárního rizika u pacientů s Cushingovým syndromem.

Podpořeno výzkumným záměrem MSM0021620807 Ministerstva školství ČR.

METALICKÁ SKVRNA A JEJÍ TERAPIE

Autoři: Martin Janega, Adam Řeháček, Taťjana Dostálová, Irena Pipková

Školitelka: prof. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc., MBA, Dětská stomatologická klinika, 2. LF UK a FN Motol

Ve stomatologii se používá celá řada kovových slitin ze skupiny ušlechtilých a neušlechtilých kovů. Je známé, že kovo-keramické korunky velice často způsobují namodralé až fialové probarvení marginální gingivy. Jedním z projevů uvolňování iontů jsou nápadné, ohraničené metalické skvrny vznikající postupem migrujících kovových částic. Tyto změny se projevují jako tetováž a jejich odstranění je velmi obtížné. V následujícím kasuistickém sdělení chceme demonstrovat možnosti parodontologicko-protetického řešení.

Parodontolog provedl jednoduchou gingivectomii v rozsahu zubu 21 s degranulací zánětlivé gingivy a osteoplastikou kosti nad zubem, rána byla kryta parodontologickým obvazem. Po 3 týdnech byla u návstavy provedena korekce preparace a polohy schůdku. Scanováním a CAD/CAM technikou jsme získali keramickou kapničku. Následně byla v laboratoři dohotovena celokeramická korunka, kterou jsme přitmelili skloionomerním cementem. U natmeleného zubu došlo k příhojení gingivy, která je zdravá, bez metalických skvrn.

TEXTURNÍ PŘÍZNAKY INTIMOMEDIÁLNÍ TLOUŠŤKY SPOLEČNÉ KAROTIDY NEMOCNÝCH S PRIMÁRNÍM HYPERALDOSTERONISMEM A ESENCIÁLNÍ HYPERTENZÍ

Autoři: Bohumil Majtan, 6. roč., Daniel Smutek, Jaromír Běláček, Zelinka Tomáš, Petrák Ondřej, Štrauch Branislav, Widimský Jiří Jr., Robert Holaj

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

Východisko: V cévách nemocných s primárním hyperaldosteronismem (PHA) ve srovnání s nemocnými s esenciální hypertenzí (EH) dochází k většímu zmnožení kolagenu vedoucímu k zvýšení cévní tuhosti a možná i nárůstu intimomediální tloušťky. Kvalitativní změny v sonografickém obrazu cévy u těchto nemocných však dosud nebyly publikovány.

Cíl: V naší práci jsme se snažili pomocí analýzy textury sonografického obrazu karotid na základě pěti texturních příznaků vycházejících z Haralickovy analýzy obrazu najít kvalitativní rozdíly mezi nemocnými s PHA a EH.

Metodika: Intimomediální komplex distálního úseku společné karotidy jsme podrobili digitální analýze u souboru 15 nemocných s PHA ve věku 58 ± 8 let, z toho 5 žen a 12 nemocných s EH ve věku 53 ± 6 let, z toho 4 ženy. Nemocní se nelišili věkem ani výškou systolického resp. diastolického krevního tlaku. Ke zpracování obrazu a výpočtu texturních příznaků byl použit script vytvořený v programu Matlab.

Výsledky: Haralickovy texturní příznaky jsou uvedeny v tabulce 1. Za signifikantní jsme považovali rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.

TABULKA 1: HARALICKOVY TEXTURNÍ PŘÍZNAKY

Texturní příznak	PHA		EH		P hodnota	
	medián	rozpětí	medián	rozpětí	medián	rozpětí
Entropie	0,0134789	0,0021259	0,0131155	0,0012901	0,12	0,04
Kontrast	0,0003468	0,0003563	0,0002957	0,0002406	0,17	0,13
Homogenita	0,0015632	0,0001750	0,0015892	0,0001111	0,16	0,07
Korelace	0,9633058	0,0905678	0,9601596	0,0584975	0,75	0,48
Uniformita	0,0000010	0,0000014	0,0000013	0,0000008	0,04	0,02

Závěr: Významné rozdíly v sonografickém obrazu karotid mezi nemocnými s PHA a EH se námi zvolenými texturními příznaky nepodařilo doposud spolehlivě prokázat.

Podpořeno grantem IGA NR/8155-5.

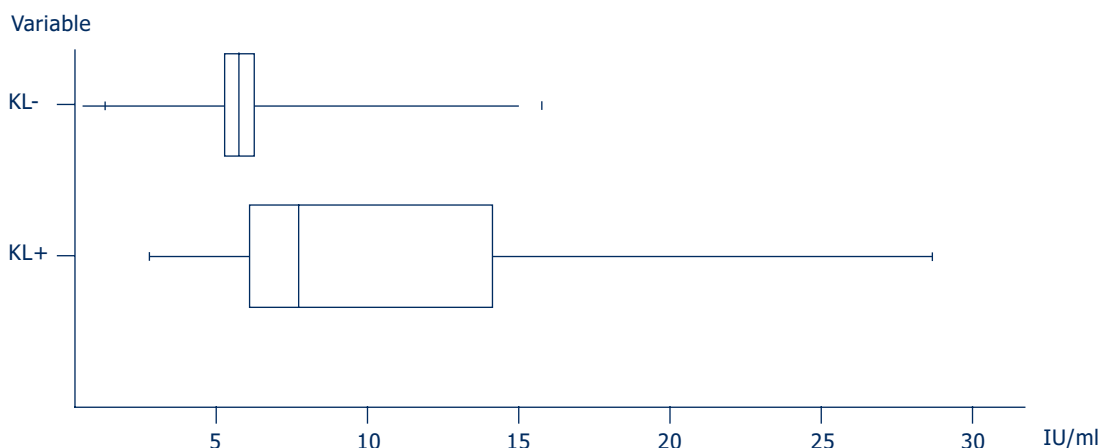
PROTILÁTKY PROTI CITRULINOVANÉMU CYKlickÉMU PEPTIDU V SÉRECH PACIENTŮ S CROHNOVOU NEMOCÍ

Autor: Lenka Nováková, 5. r.

Školitel: MUDr. Karin Malíčková, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Nespecifické střevní záněty (inflammatory bowel disease, IBD) jsou chronická střevní zánětlivá onemocnění, primárně se projevující v gastrointestinálním traktu bolestmi břicha a průjmy. Nejdůležitějšími představiteli IBD jsou ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova nemoc (CN). U mnohých postižených se vyskytují četné extraintestinální projevy, přičemž nejčastějšími jsou asymetrické migrující artritidy a spondylitidy s prevalencí mezi 7% až 25%. Kloubní postižení u IBD je následkem imunopatologického zánětu, který je charakterizován mj. vysokou aktivitou indukovaného syntetázy oxidu dusnatého (iNOS). Ta způsobuje citrulinaci (deiminaci) proteinů, vedoucí ke zvýšení antigenicity těchto proteinů. Test na přítomnost protilátek proti citrulinovanému cyklickému peptidu (anti-CCP) je v současné době používán jako vysoce specifický a senzitivní pro diagnostiku revmatoidní artritidy, kdy jsou protilátky detekovatelné ještě před nástupem klinického kloubního postižení. Mým zájmem byla detekce anti-CCP u pacientů s CN. V této skupině nemocných jsem hledala souvislost mezi sérovou koncentrací anti-CCP a výskytem zánětlivých kloubních obtíží.

Metodika: Vyšetřila jsem 71 sér nemocných s CN. Vzorky byly vybrány prostým náhodným výběrem ze souboru nemocných s CN, vyšetřených v ÚKBLD VFN v roce 2006. Z lékařské dokumentace jsem zjistila informace o místě a rozsahu střevního postižení pacientů a o výskytu mimostřevních komplikací. U 14 osob (19,7%) ze souboru byl zjištěn výskyt artralgií až artritid. Vzorky sér jsem analyzovala na přítomnost anti-CCP, ke stanovení protilátek jsem použila enzymovou imunoanalýzu (Immunoscan RA, EuroDiagnostica, Nizozemsko). Výsledky jsem statisticky analyzovala Mann-Whitneyovým testem.



OBR. 1 SROVNÁNÍ KONCENTRACÍ ANTI-CCP V SÉRECH NEMOCNÝCH S CN; KL+ – KLOUBNÍ EXTRAINTESTINÁLNÍ PROJEVY, KL- – BEZ KLOUBNÍCH OBTÍŽÍ

Výsledky: U pacientů s CN bez kloubních komplikací byly sérové hladiny anti-CCP velmi nízké. U nemocných s artritidami byly nalezeny vyšší hodnoty (Obrázek 1), rozdíl však nebyl statisticky významný ($p=0,2$). Hladiny anti-CCP nekorelovaly s hodnotami ostatních autoprotilátek, běžně užívaných k diagnostice CN.

Závěr: Nenašla jsem signifikantní korelaci mezi hodnotami anti-CCP a extraintestinálními kloubními projevy IBD. Z výsledků usuzuji, že význam anti-CCP pro predikci arthropatií u IBD je nutno dále ověřit v prospektivních studiích. Bylo by dobré rozšířit rozsah výběru tak, aby bylo možné uplatnit parametrické statistické metody a zvýšit tak statistickou sílu výzkumu.

PROMĚŘOVÁNÍ RENTGENOVÝCH SNÍMKŮ PRO 3-D POČÍTAČOVÉ PLÁNOVÁNÍ A REKONSTRUKCI U ČELISTNÍCH ANOMÁLIÍ

Autoři: Adam Řeháček, 2. roč., Martin Janega

Školitel: prof. MUDr. Dostálová Tat'jana, DrSc., Dětská stomatologická klinika 2. LF UK a FN Motol

Abstrakt: Počítačem navigované plánování a vlastní provedení chirurgických výkonů snižuje invazivnost těchto metod, zvyšuje přesnost a zlepšuje chirurgické plánování a analýzu. Kraniofaciální anomálie a jemné anatomické detaily u úrazů v orofaciální oblasti mohou být velmi dobře sledovány pomocí těchto zobrazovacích technik. Současný technický pokrok v této oblasti přinesl řadu nových technologií i metod dovolujících analyzovat změny v oblasti obličeje ve dvou nebo třech rovinách. Jednou z takovýchto metod je kefalometrie. Čelistní a obličejová chirurgie stále častěji využívá 3-D zobrazování pro porovnání stavu před a po operaci, k dosažení funkčního i estetického maxima. Je to ideální metoda popisující změny tvrdých a měkkých tkání s velkou přesností, umožňující detailní morfometrickou analýzu 3-D modelů. Cílem naší práce je proměřit rentgenové snímky hlav většího počtu zdravých pacientů bez jakýchkoli ortodontických anomálií a z naměřených hodnot vypočítat střední hodnoty lebečních parametrů a parametrů měkkých tkání průměrného (ideálního) českého muže a české ženy.

Tato střední hodnota umožní počítačově simulovat výsledek chirurgického řešení, kdy budou zobrazeny jak změny tvrdých tkání, tak i změny morfologie tkání měkkých.

STANOVENÍ PRODUKCE INTERFERONU GAMA BUŇKAMI NATURAL KILLERS S POMOCÍ ŠESTIBAREVNÉ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Autor: Lucia Skáčiková, 6. roč.

Školitel: as. MUDr. Helena Marečková, CSc., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF a VFN a Ústav klinické biologie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

NK buňky (natural killers) jsou lymfocyty schopné rychle zabít některé nádorové a virem infikované buňky. Stanovují se průtokovou cytometrií (CD3-/CD16+,56+) a produkují různé cytokiny včetně interferonu gamma (IFN γ). Hladiny IFN γ jsou zvýšené u různých imunopatologických stavů včetně námi sledovaných pacientů s roztroušenou sklerózou a pacientek s poruchou fertility. Rutinně se IFN γ měří v séru metodou ELISA, její nevýhodou je nízká citlivost a neschopnost určení subpopulace buněk produkujících tento cytokin. To lze např. testem stanovení produkce intracelulárních cytokinů cytometrem. Řešení úskalí této metody bylo cílem naší práce. Stimulací buněk, nutné pro nízkou produkci cytokinů v klidovém stavu, klesá exprese nejužívanějšího znaku pro charakteristiku NK buněk - CD56, a proto jsme hledali jiný vhodný znak. Po porovnání různých molekul na povrchu NK buněk jsme vybrali molekulu CD94. Ta je v malém množství zastoupena i na subpopulacích T lymfocytů, a tak jsme použili šestibarevnou průtokovou cytometrii pro určení dalších znaků odlišujících populace s možnou expresí CD94.

Metodika: 37 pacientů, periferní krev po odběru stimulována phorbó myristate acetatem a ionomycinem za přítomnosti brefeldinu A, následovala permeabilizace a značení monoklonálními protilátkami (proti IFN γ , IFN γ -receptoru, CD3, CD4, CD8, CD94 – BD Bioscience) a analýza na průtokovém cytometru FACSCanto.

Výsledky: produkce IFN γ byla v průměru u 48,6% CD94+ buněk (s =13,0) a u 24,3% CD3+ buněk (s=10,1), poměr produkce IFN γ v CD94/CD3 byl v rozmezí 0,86–4,78.

Závěr: Práce demonstruje vhodnost využití naší metodiky pro stanovení produkce cytokinů NK buňkami.

LAICKÁ PRVNÍ POMOC- MŮŽEME POTŘEBOVAT I MY

Autoři: Andrea Špeldová 2. roč., MUDr. M. Ingrischová, II. interní klinika – klinika angiologie a kardiologie 1. LF UK a VFN, MUDr. B. Jindrová KARIM 1. LF UK a VFN

Školitel: odb. as. MUDr. V. Vávra, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. LF UK a VFN

Úvod: laická první pomoc – její včasné a správné poskytnutí může zabránit ireverzibilním změnám v CNS. Tyto nastávají po třech až pěti minutách hypoxie. Jak praktické, tak teoretické vědomosti absolventů námi pořádaných kurzů umožní poskytnutí neodkladné první pomoci do příjezdu odborné lékařské služby (RZP, RLP). Výuka laické první pomoci zcela vymizela z výukových osnov na všech stupních vzdělání. Kurz první pomoci je strukturován jako dvouhodinová lekce rozdělená na teoretickou a praktickou část. V teoretické části jsou účastníci seznámeni se základy kardiopulmonální resuscitace (KPR) a s dalšími postupy v život ohrožujících situacích. V praktické části mají účastníci možnost si techniku KPR vyzkoušet na modelu. Přednášky probíhají pravidelně 1x měsíčně v Akademickém klubu a příležitostně na středních školách a jiných místech. Na výuce se podílí mladí lékaři VFN a studenti 1. LF UK pod vedením odb. as. MUDr. V. Vávry.

Metodika: Pomocí dotazníku jsme srovnávali znalosti KPR odborné a laické veřejnosti.

Výsledky: Z dotazníkového šetření vyplynulo, že laická veřejnost má obecně malé povědomí o poskytování KPR.

Závěr: Z výše uvedeného výsledku vyplývá potřeba kontinuálního vzdělávání laické veřejnosti v problematice KPR. Od vzniku projektu v roce 2005 do dubna 2007 bylo proškoleny přes 2000 účastníků.

Zájem o znalost základních technik laické první pomoci se stále zvyšuje.

POČÍTAČOVÁ PODPORA KLINICKÝCH STUDIÍ V ENDOKRINOLOGII, METABOLISMU A SONOGRAFII

Autor: Bc. Zdeněk Telička, 1. roč.

Školitel: MUDr. Jan Jiskra, Ph.D., III. interní klinika-klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

K zaznamenávání sledovaných informací získaných vyšetřeními pacientů (klinickým, laboratorním a zobrazovacími metodami) používají lékaři v klinickém výzkumu nejčastěji tabulkové procesory. Důvodem je absence vhodného programového prostředku, který by byl součástí nemocničního informačního systému a který by umožnil ukládání předem definovaných parametrů, které lékaři požadují sledovat. Nedostatkem tabulkových procesorů je nemožnost sdílet databázi pacientů mezi více lékaři a časová náročnost, protože lékař je nucen během vyšetření pacienta zadávat informace do nemocničního informačního systému a následně si zapsat údaje, které hodlá sledovat.

Projekt se zabývá vývojem relační databázové aplikace a jejího uživatelského prostředí, která umožní ukládání požadovaných dat, ale hlavně zjednoduší jejich zpracování pro klinický výzkum. Databáze rovněž umožňuje sdílet data mezi různými pracovišti kliniky a zvýšit efektivitu práce výzkumných týmů. Struktura databázové aplikace je navrhována v úzké spolupráci s lékaři tak, aby maximálně pokrývala potřeby klinických pracovišť, ale zároveň tak, aby její používání nekladlo zvýšené časové nároky na vyšetření pacienta. Součástí vyvíjené aplikace jsou funkce na oboustrannou výměnu dat s nemocničním informačním systémem. Při vyšetření pacienta lékař zadává informace pouze jednou. V jediné databázi mají lékaři k dispozici parametry klinických vyšetření, zobrazovacích metod a laboratorních výsledků.

Vývoj aplikace pokračuje druhým rokem a lékaři ji využívají již od prvních funkčních verzí. Uživatelské prostředí se skládá z modulů, které jsou navrženy pro jednotlivá pracoviště III. interní kliniky. V současné době aplikaci využívají endokrinologická pracoviště a připravuje se její rozšíření pro osteocentrum. Databáze již nyní obsahuje data získaná od stovek pacientů, což jí činí výkonným nástrojem v klinickém výzkumu.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY

ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY

- Dvořák Karel, MUDr., 1. r.
- Fornůstková Daniela, Mgr., 3. r.
- Glierová Hana, Mgr., 3. r.
- Homolová Kateřina, Ing., 3. r.
- Kalmárová Markéta, Mgr., 6. r.
- Krtil Jan, MUDr., 6. r.
- Lacina Lukáš, MUDr., 3. r.
- Leníček Martin, MUDr., 4. r.
- Linetskiy Igor, MUDr., 3. r.
- Majer Filip, Mgr., 3. r.
- Malínská Hana, Mgr., 5. r.
- Panigaj Martin, Mgr., 4. r.
- Pejznochová Martina, Mgr., 3. r.
- Procházková Jana, Mgr., 4. r.
- Spišáková Martina, Mgr., 5. r.
- Stibůrek Lukáš, Mgr., 4. r.
- Štránská Zuzana, MUDr., 2. r.
- Švarcová Jana, Mgr., 3. r.
- Ulbrichová Dana, Mgr., 4. r.
- Vlček Marek, MUDr., 3. r.
- Vojtová Lucie, Ing., 3. r.
- Záhoráková Daniela, Mgr., 5. r.
- Zanvit Petr, Mgr., 6. r.
- Zelenka Jaroslav, Ing., 3. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

- předseda:** prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
členové: doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.
prof. MUDr. Rastislav Druga, DrSc.

**NEALKOHOLICKÁ STEATOHEPATITIDA U PACIENTŮ S DIABETEM 2. TYPU****Autoři:** Karel Dvořák, Tůma L., Švestka T., Zeman M., Žák A., Brůha R.**Školitel:** doc. MUDr. Radan Brůha, CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Nealkoholická steatohepatitida (NASH) je charakterizována steatotickým postižením jater (většinou makrovezikulární steatózou), které není způsobeno alkoholem. Nejčastější příčinou NASH je metabolický syndrom charakterizovaný přítomností obezity, diabetu, hypertenze a hypertriglyceridémie. Základním patofyziologickým podkladem tohoto syndromu je pravděpodobně inzulinová rezistence. Na rozdíl od prosté steatózy, která je benigním onemocněním, přechází NASH až u 20% pacientů do stadia jaterní cirhózy a je tak asi nejčastější příčinou tzv. kryptogenní cirhózy. Cílem pilotní studie bylo zjistit četnost jaterního poškození u pacientů s diabetem 2 typu sledovaných na našem pracovišti a posoudit, zda přítomnost jaterní léze souvisí s dlouhodobou kompenzací diabetu.

Pacienti a metody: Bylo vyšetřeno 262 pacientů (151 mužů a 111 žen) ve věku od 24 do 89 let (průměr 61,7), kterým byl v průběhu roku 2006 vyšetřován na IV.interní klinice VFN glykosylovaný hemoglobin. Skupina byla rozdělena na pacienty se špatně kompenzovaným diabetem a pacienty kompenzované. Jako parametr kompenzace diabetu byla zvolena hodnota glykosylovaného hemoglobinu. Kritériem přítomnosti jaterního poškození bylo zvýšení ALT či AST nad normu.

Výsledky: 67,8% pacientů mělo dobře kompenzovaný diabetes, u 32,2% pacientů byl diabetes kompenzován špatně (glykovaný hemoglobin nad 0,06). Patologické jaterní testy (ALT, AST) mělo 18,8% pacientů s dobře kompenzovaným diabetem a 18,4% pacientů s diabetem kompenzovaným špatně. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v četnosti jaterního poškození mezi oběma skupinami pacientů.

Závěr: Zdá se, že aktuální stav kompenzace diabetu nemá vliv na četnost či závažnost jaterního poškození u pacientů s diabetem 2. typu. Etiologickým faktorem tedy nejspíše není samotná hyperglykémie, ale pravděpodobně faktory vedoucí ke vzniku samotného diabetu – např. inzulinová rezistence.

DEPLETION OF COX5A SUBUNIT IN HEK293 CELL LINE USING RNAI.**Authors:** Daniela Fornůstková, 3. roč., Stibůrek L, Pejznochová M, Zeman J**Supervisor:** Prof. MUDr. J. Zeman, DrSc, Department of Paediatrics, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine

COX5A is one of 13 structural subunits of cytochrome c oxidase (COX), the terminal enzyme of respiratory chain. We used RNAi to analyze impact of decreased steady-state of COX5A on COX assembly. RNAi down-regulate post-transcriptionally gene expression by siRNAs or miRNAs. We chose plasmid-based RNAi expressing short hairpins embedded within a miRNA context from the naturally occurring miR30 to mimic a natural microRNA primary transcript.

We constructed seven derivatives of the plasmid coding for hairpins aimed at different positions of COX5A mRNA. A long half-life of COX5A (the level of the protein is at least 48 hours post nucleofection unchanged on Western Blot) contradict the screening of RNAi using immunodetection of endogenous COX5A in transiently transfected cells. Thus we optimized screening method that estimate silencing potential of candidate shRNAs. In principle, the method is based on detection of marker, which is translated from transcript with RNAi-target sequence using Western Blot or FACS (the higher the level of marker the higher the leakage of individual hairpin-mediated RISC systems).

Based on the above-mentioned method, we chose three candidate shRNAs and prepared stable cell lines, where depletion of COX5A level was confirmed using SDS immunoblotting. Also specific activity of COX was revealed decreased. BN-PAGE showed diminished level of COX holoenzyme and its assembly intermediates.

Supported by grants GAUK 1/2006/R and GACR 303/03/H065.

CELLULAR PRION PROTEIN IS INVOLVED IN MOUSE ERYTHRIPESIS**Authors:** Hana Glierová, 3. roč., Panigaj M., Živný J.*, Holada K., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN*, Ústav patologické fyziologie 1. LF UK**Supervisor:** Dr. Ing. Karel Holada, Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Cellular prion protein (PrP^c) is a membrane glycoprotein which plays a key role in pathogenesis of neurodegenerative disorders known as transmissible spongiform encephalopathies (TSE). Erythroid cells specific α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is one of potential markers of TSE. Its expression is downregulated in the course of prion infection suggesting possible connection between erythropoiesis and TSE pathogenesis.

Our previous data showed that induction of erythroid differentiation of MEL cells leads to increased expression of PrP^c. To study involvement of PrP^c in erythropoiesis an acute haemolytic anemia was induced in wild type (WT) and PrP^c knock out mice (PrP^{-/-}) by i.p. administration of phenylhydrazine (PHZ). A rapid decrease in hematocrit (HCT) in both mice during first day after induction of anemia was followed by increased expression of erythropoietin (EPO) mRNA in kidneys and higher plasma levels of EPO. However the normalization of HCT levels in PrP^{-/-} mice was significantly protracted. To confirm the role of PrP^c expression we compared the effect of PHZ in PrP^{-/-} and Tga20 mice (PrP^{-/-} with randomly reintroduced Prnp gene). Again the course of anemia was significantly deeper in PrP^{-/-} mice. Our results

imply that PrPc plays a role in erythropoiesis or affects the ability of PrP-/- erythroid cells to deal with the oxidative stress caused by PHZ.

GAČR 310/04/0419, 310/05/H533, MSM 0021620806

QUANTIFICATION OF NORMALLY AND ABERRANTLY SPLICED VARIANTS OF METHIONINE SYNTHASE REDUCTASE GENE IN PATIENTS WITH CbLE TYPE OF HOMOCYSTINURIA

Authors: Kateřina Homolová, 3. roč., Petra Zavadáková and Viktor Kožich

Supervisor: doc. MUDr. Viktor Kožich, CSc., Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN

In a cohort of 9 cblE patients of European origin with disease causing mutations in methionine synthase reductase gene (MTRR) 7 patients carry nonsense mutations in one or both alleles. The most common pathogenic mutation in the MTRR gene is an unusual intronic substitution c.903+469T>C, which causes an aberrant splicing of MTRR transcript and stop codon formation. RT-PCR analysis revealed that the extent of missplicing is incomplete as we detected normally spliced mRNA even in homozygous patients. The aim of our study was to quantify normal, mutant and total MTRR mRNA in primary human fibroblasts from 9 cblE patients and 5 controls using a real-time RT-PCR. Amplification with SYBR Green detection was highly specific for desired splice variants and was sensitive to one gene copy per reaction. All data were normalized to average expression of 3 internal control genes HPRT1, TBP and GAPDH validated by geNorm program (M = 0.42). The expression of total MTRR transcript in 5 patients carrying c.903+469T>C in one or two alleles was significantly 2-fold lower ($p < 0.05$) confirming the instability of aberrantly spliced mRNA, whereas expression in 4 cblE patients with other mutant MTRR alleles was not changed compared to controls. Expression of total MTRR transcript in two patients homozygous for c.903+469T>C is decreased to 26% compared to controls. The abundance of MTRR mRNA in heterozygous patients varies from 17% to 93% depending on mutation present in second allele. Our results also showed that up to 16% of correctly spliced mRNA is formed from mutant transcript in homozygous patients however it accounts for only 4% of wild type MTRR mRNA production in controls. On the other hand, even healthy controls produce very small amount (< 0.5) of aberrantly spliced isoform. Our results suggest that the intronic substitution leads to an expression shift between two MTRR splice variants towards unstable truncated isoform. The setting up of RT-qPCR technique for quantification of MTRR splicing variants provides a valuable tool for monitoring of effects of therapeutic interventions known to influence splicing.

This study was supported by grant No. 303/03/H065 from the Grant Agency of Czech Republic and by Research project of Charles university No. VZ MSM CR 0020620806.

POSITIONING OF NORS AND NOR-BEARING CHROMOSOMES IN RELATION TO NUCLEOLI

Authors: Markéta Kalmárová, 6. roč., Evgeny Smirnov, Martin Mašata, Karel Koberna, Helena Fidlerová, Ivan Raška

Supervisor: prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., Ústav buněčné biologie a patologie 1. LF UK a Oddělení buněčné biologie, Fyziologický ústav AV ČR

It is widely accepted that chromosomes occupy more or less fixed positions in mammalian interphase nucleus. However, relation between large-scale order of chromosome positioning and gene activity remains unclear. We used the model of the human ribosomal genes to address specific aspects of this problem. Ribosomal genes are organized in clusters termed nucleolus organizer regions (NORs). Only some NORs, called „competent“, are transcriptionally active, while the rest remain silent. Importantly in this respect, the regularities in distribution of active and non-active NORs among the specific chromosomes were already established in two human-derived cell lines: transformed HeLa and primary LEP cells. In the present study, using FISH and immunocytochemistry, we found that in HeLa and LEP cells the large-scale positioning of the NOR-bearing chromosomes with regard to nucleoli is closely linked to the transcription activity of rDNA. Namely, the tendency of rDNA-bearing chromosomes to associate with nucleoli correlates with the number of transcriptionally active NORs in the respective chromosome homologs. Most of the silent NORs are included in the nucleoli. Some intranucleolar NORs (supposedly silent) are situated on elongated chromatin protrusions connecting nucleoli with respective chromosome territories spatially separated from nucleoli.

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic MSM0021620806 and LC535, the Grant Agency of Sciences of the Czech Republic AV0250110509, the Wellcome Trust 075834/04/Z and the Grant Agency of the Czech Republic 304/04/0692, 304/05/0374, 304/06/1662 and 304/06/1691.

**ZNÁMKY REGENERACE PODOCYTŮ PO POŠKOZENÍ PUROMYCINEM****Autor:** Jan Krtil, 6. roč.**Školitel:** prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Podocyty jsou terminálně diferencované epiteliální buňky, které vytvářejí zevní vrstvu glomerulární filtrační bariéry. Jejich poškození vede k rozvoji proteinúrie. Obecně se předpokládá, že podocyty mají velmi omezený regenerační potenciál, nicméně je naznačována možnost jejich proliferace po poškození. Cílem naší práce bylo zjistit, zda primárně kultivované podocyty poškozené aminonukleosidem puromycinu (PAN) mají tendenci proliferovat během restituce po poškození.

Metodika: Primárně kultivované diferencované potkanní podocyty byly in vitro poškozeny PAN (10 a 50 µg/ml, 24 hod.). Po inkubaci s PAN bylo médium odstraněno a nahrazeno běžným kultivačním médiem s 10% FBS. Po 1, 4 a 7 dnech restituce byla analyzována celková metabolická aktivita podocytů MTT testem a proliferační aktivita expresí PCNA (Western blotting). Před a po aplikaci PAN byla imunofluorescencí stanovena hustota vitálních buněk a sledována exprese některých podocytárních proteinů (WT-1, synaptopodin, CD2AP).

Výsledky: Hustota viabilních buněk je redukována v závislosti na koncentraci PAN. Metabolická aktivita podocytů po PAN 10 µg/ml stoupá od 1. dne restituce. Expres PCNA se zvyšuje během 1. dne restituce, poté dochází opět k poklesu v závislosti na koncentraci PAN.

Závěr: Nízká koncentrace PAN může indukovat určitou regenerativní odpověď, zatímco vysoká koncentrace působí na podocyty výhradně toxicky.

VLIV BUNĚK NÁDOROVÉHO STROMATU NA FENOTYP NORMÁLNÍCH LIDSKÝCH KERATINOCYTŮ**Autoři:** Lukáš Lacina, 3. roč., Dvořánková B., Čada Z., Smetana K. Jr.**Školitel:** prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc., Jr., Anatomický ústav 1. LF UK

Úvod: Interakce mezi epitelem a mezenchymem jsou důležité nejen pro vývoj kůže a sliznic prenatálně, ale uplatňují se i v průběhu regenerace při rozvoji maligních nádorových onemocnění. Zdá se, že právě tato interakce se může spolupodílet na agresivitě vznikajícího nádoru a jeho schopnosti metastazovat.

Cíl studie: Sledování vlivu buněk nádorového stromatu izolovaných z bazocelulárního /BCC/ a spinocelulárního /SCC/ karcinomu na fenotypové změny interfolikulárních keratinocytů navozené v průběhu kokultivace.

Metodika: Fenotyp lidských maligních nádorů (BCC a SCC) byl porovnáván s fenotypem normálních interfolikulárních keratinocytů kokultivovaných in vitro s různými typy fibroblastů, včetně fibroblastů izolovaných ze stromatu BCC a SCC. Imunocytochemicky byla detekována exprese keratinů (K8, K14, K19), tří typů endogenních lektinů tj galektinu (Gal-1, Gal-3 a Gal-7) a vazebných míst pro ne, proliferačního markeru Ki-67, nukleolárního proteinu nukleosteminu a membránového epiteliálního antigenu Ber-EP4. Zároveň byl studován i fenotyp a karyotyp fibroblastu izolovaných ze stromatu BCC a SCC. Tumorigenicita těchto stromálních buněk byla testována jejich implantací do podkoží NOD/LtSz-Rag1null myši.

Výsledky: U sledovaných stromálních buněk nebyla pokusem in vivo prokázána jejich tumorigenicita. Naopak při kokultivaci s normálními keratinocyty in vitro dokázaly tyto buněk indukovat v epitelu fenotypové změny blízké fenotypu nádoru, ze kterého byly stromální buněk izolovány (K-19, Ber-EP4, K-8), zároveň došlo k expresi některých markeru poukazujících na nízkou úroveň diferenciaci epiteliálních buněk (vazebná místa pro Gal-1 a nukleostemin). Provedení kokultivace v insertovém systému (oddělení různých typů buněk membránou) ukázalo, že vyvolané změny nejsou závislé na přímém kontaktu buněk.

Závěr: Fenotypové změny indukované u normálních keratinocytů vlivem nádorových stromálních fibroblastů poukazují na význam role stromatu v procesu nádorového onemocnění. Nádorové stroma se tak může aktivně podílet na tvorbě specifického mikroprostředí nutného k rozvoji maligního onemocnění a jeho resistenci k terapeutickým zásahům.

JEDNODUCHÁ A PŘESNÁ METODA STANOVENÍ SÉROVÉ KONCENTRACE 7 α -HYDROXY-4-CHOLESTENU-3-ONU, MARKERU MALABSORPCE ŽLUČOVÝCH KYSELIN**Autoři:** Martin Leníček, 4. roč., J. Zelenka, M. Bortlík, M. Lukáš, L. Vitek**Školitel:** doc. MUDr. Libor Vitek, PhD., MBA, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Stanovení malabsorpce žlučových kyselin (BAM) představuje, zejména v gastroenterologii, důležitý diagnostický nástroj. Překvapivě je jen velmi málo metod, které lze k určení BAM použít. Takzvaný „zlatý standard“ ⁷⁵SeHCAT není v celé řadě zemí povolen (včetně ČR) a stanovení množství žlučových kyselin (BA) ve stolici za 24 hodin se prakticky neprovádí. BAM lze určit pomocí sérových koncentrací 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-onu (cholestenu), meziproductu syntézy BA. Stanovení tohoto analytu vyžaduje komplikovanou extrakci na pevné fázi při 64°C, což brání rutinnímu použití.

Metodika: Tento limitující krok jsme obešli navržením nové metody extrakce. Cholesten je extrahován chloroform: methanolem (2:1 v/v) a v toluenu nanesen na křemíkovou předkolonku za pokojové teploty. Po promytí hexanem a hexan-isopropanolem (99,6:0,4 v/v) je eluován 1ml isopropanolu. Vzorek je po odpaření a rozpuštění v acetonitrilu separován pomocí HPLC (kolona C18, mobilní fáze acetonitril:voda 95:5 v/v, detekce 241nm). 7β-hydroxy-4-cholesten-3-on slouží jako vnitřní standard.

Výsledky: Popisovaná metoda je přesná, citlivá a lineární v širokém rozmezí (2 to 500 ng/ml). Na souboru čítajícím asi 400 jedinců byl stanoven medián sérové koncentrace cholestenu na 12ng/ml u zdravých jedinců, zatímco u pacientů s Crohnovou chorobou po resekci terminálního ilea byly koncentrace až 450ng/ml (medián 129ng/ml).

Závěr: Nově popisovaná metoda nabízí spolehlivý nástroj k určení BAM, který může být jednoduše uveden do rutinního laboratorního provozu.

DENTÁLNÍ SLITINY A JEJICH VLIV NA KVALITU VÝSLEDKŮ VYŠETŘENÍ V MAGNETICKÉ REZONANCI

Autoři: Igor Linetskiy, 3. roč., Hubálková H., Starčuk Z.

Školitelka: doc. MUDr. Hana Hubálková, PhD., Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Kvalita výsledků vyšetření metodou magnetické rezonance v oblasti hlavy a krku může být výrazně ovlivněna přítomnými kovovými předměty. Nejčastěji to jsou fixní protetické práce zhotovené z různých dentálních slitin, dentální implantáty, fixní ortodontické aparáty a chirurgické dlahy. Jejich interakce s magnetickými poli MR přístroje může způsobit vznik artefaktu výsledného obrazu. Obvykle se projevuje jako výpadek části obrazu v podobě černé díry který omezuje, a v některých případech i znemožňuje vyhodnocení výsledků vyšetření. Velikost a tvar artefaktu jsou přímo závislé na magnetické susceptibilitě kovového předmětu. Na výsledcích MR testování 47 dentálních slitin od českých a zahraničních výrobců a stanovení hodnot jejich magnetické susceptibilitu autoři hodnotí závislost velikosti a tvaru artefaktů způsobených dentálními kovovými předměty a vyslovují doporučení pro klinickou praxi .

ÚLOHA GANGLIOSIDŮ U ESTROGENY INDUKOVANÉ CHOLESTÁZY

Autor: Filip Majer, 3. roč.

Školitel: doc. RNDr. František Šmíd, CSc., Hepatologická laboratoř, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Glykolipidy jsou významnou složkou vnější vrstvy lipidní dvojvrstvy plasmatické membrány. Mají důležitou roli jako markery a receptory buněčného povrchu, a jejich rigidnější molekuly činí povrch buňky mechanicky stabilnější a chemicky resistantní. U estrogenu indukované cholestázy, která je modelem cholestázy indukované orálními kontraceptivy a těhotenské cholestázy, byl zjištěn pokles tekutosti plasmatické membrány.

Metody: V naší studii jsme srovnávali složení gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar se složením v játrech potkanů, u nichž byla indukována cholestáza 17- α -ethinylestradiolem (EE) (5mg/1 kg b.wt) po dobu 18 dnů. Celkové gangliosidy v jaterním homogenátu byly stanoveny spektrofotometricky a jednotlivé gangliosidy denzitometricky po rozdělení na TLC s detekcí resorcinolovým činidlem. Na histologických řezech byla provedena detekce gangliosidů pomocí bakteriálních toxinů vázajících gangliosidy a membránových transportérů k určení lokalizace gangliosidů v rámci jaterního lalůčku a hepatocytu. Dále byla stanovena hladina mRNA dvou vytipovaných enzymů podílejících se na biosyntéze gangliosidů metodou RT-PCR.

Výsledky: Výsledky ukazují na zvýšení množství gangliosidů, hlavně b-větve biosyntézy. Dále jsme prokázali přesun gangliosidu GM1 do sinusoidálních prostorů. Hladiny mRNA GD3 a GM1-syntázy se ukázali jako nezměněné.

Závěr: Výsledky ukazují, že zvýšení celkových gangliosidů odpovídá nárůstu gangliosidů b-větve biosyntézy, které by mohly být zodpovědné za zvýšení rigidity membrány. Změny v lokalizaci GM1 mohou souviset s reakcí hepatocytů na detergentní účinek žlučových kyselin u cholestázy.

Podpořeno IGAMZ 9366-3

SÉROVÉ KONCENTRACE ADIPONEKTINU VE VZTAHU K INZULÍNOVÉ REZISTENCI PERIFERNÍCH TKÁNÍ U EXPERIMENTÁLNÍCH MODELŮ METABOLICKÉHO SYNDROMU

Autorky: Hana Malínská, 5. roč., M. Burešová, I. Marková, L. Kazdová

Školitelka: RNDr. Eva Tvrzická, CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Adiponektin je protein produkovaný v tukové tkáni, který je secernován do cirkulace, kde jsou jeho koncentrace 1000x vyšší než inzulínu. Jeho exprese a plasmatické koncentrace jsou sníženy při obezitě, inzulínové rezistenci a diabetu 2 typu. V současné době chybí podrobnější poznatky o regulaci jeho sekrece, zapojení do lipidového metabolismu a glukoregulace při inzulínové rezistenci. V provedené studii jsme u experimentálních modelů inzulínové rezistence asociované s obezitou a bez obezity sledovali sérové koncentrace adiponektinu ve vztahu k váze epididymálního tukového tělesa jako ukazatele viscerální tukové tkáně, k sérovým koncentracím triglyceridů a rezistenci svalové a tukové tkáně k účinku inzulínu.



Metody: Pokusy byly provedeny u dospělých samců a) u neobesních hypertriglyceridemických potkanů (HHTg) ve stáří 4 a 18 měsíců, b) u obézních potkanů kmene Zucker a c) u neobézních spontánně hypertenzních potkanů (SHR) krmených po dobu 2 týdnů dietou obsahující 60% fruktózy. Kontrolní skupiny tvořili neobézní normotriglyceridemičtí potkani odpovídajícího věku a kmene. Koncentrace adiponektinu byly stanoveny metodou ELISA (B-Bridge Inc., USA.) Resistence kosterních svalů (m. soleus) a tukové tkáně k účinku inzulínu byla sledována podle inzulínem stimulované inkorporace ^{14}C -U-glukózy do glykogenu a lipidů.

Výsledky: U obézních potkanů byly nízké hladiny adiponektinu spojeny s vyšší vahou tukového tělesa a výrazně zvýšenou hypertriglyceridemií a s téměř úplnou rezistencí tukové a svalové tkáně k účinku inzulínu. Naproti tomu u neobézních HHTg a kontrolních potkanů nebyly koncentrace adiponektinu rozdílné ve stáří 4 ani 18 měsíců, přestože HHTg potkani měli vyšší triglyceridemií a zhoršenou inzulínovou rezistenci svalové a tukové tkáně. U obou těchto skupin došlo v průběhu stárnutí ke stejnému poklesu sérových koncentrací adiponektinu. Podávání fruktóзовé diety, které zvýšilo sérové triglyceridy a inzulínovou rezistenci tkání, koncentrace adiponektinu neovlivnilo.

Skupina	Epid. tukové těleso, g/100g	s- triglyceridy mmol/l	s-adiponektin $\mu\text{g/ml}$
K-Wistar 4 měs.	1,55 \pm 0,07	0,85 \pm 0,07 ^a	3,17 \pm 0,31 ^a
K-Wistar 18 měs.	1,72 \pm 0,07	1,17 \pm 0,07 ^a	2,25 \pm 0,12 ^a
HHTg 4 měs.	1,39 \pm 0,06 ^b	2,95 \pm 0,21 ^b	3,32 \pm 0,18 ^b
HHTg 18 měs.	1,87 \pm 0,09 ^b	3,83 \pm 0,41 ^b	2,44 \pm 0,20 ^b
SHR 4 měs.	1,05 \pm 0,05	0,54 \pm 0,09 ^c	6,16 \pm 0,61
SHR 4 měs. + fruktóza	1,05 \pm 0,04	0,99 \pm 0,18 ^c	5,63 \pm 0,92
Zucker-obézní 4 měs.	2,75 \pm 0,09	2,81 \pm 0,26	1,86 \pm 0,17

Hodnoty označené stejným indexem jsou statisticky významně rozdílné.

Závěr: Zjištěná korelace mezi vahou epididymálního tukového tělesa a sérovými koncentracemi adiponektinu ($r=-0,82$, $p<0,02$) podporují hypotézu o závislosti sekrece adiponektinu na množství tukové tkáně. Výsledky naznačují i úlohu snížených koncentrací adiponektinu při zhoršování inzulínové senzitivity tkání s přibývajícím věkem. Naproti tomu hereditární hypertriglyceridemie ani nutričně indukovaná inzulínová rezistence nebyly spojeny s rozdílnými hladinami adiponektinu v séru.

RNA INTERFERENCE OF PRION GENE IN ERYTHROID DIFFERENTIATION

Authors: Martin Panigaj, 4. roč., Karel Holada

Supervisor: Dr. Ing. Karel Holada, PhD., Institute of Immunology and Microbiology First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital

Although cellular prion protein (PrP^C) is of a great medical importance, its role in physiological processes remains enigmatic. Our preliminary study suggested its involvement in murine erythropoiesis. In order to search for its function in erythroid differentiation, we employed RNA interference to inhibit expression of PrP^C gene (Prnp) in murine erythroleukemia cells (MEL), which represent well established model for in vitro erythroid differentiation. For this purpose we designed model system constituted by retroviral vector expressing short hairpin RNA (shRNA) under the U6 promotor. For these shRNA we utilized one published and two own designed sequences targeted along the Prnp mRNA molecule. Retroviral vectors with inserted shRNA sequences were transfected to MEL cells and selected with puromycin. Screening of individual cell populations after transfection revealed that published sequence reached modest inhibition (~50%) of Prnp, but own-designed sequences were not effective. Preliminary results led us to hypothesize that a) selected cell populations are heterogeneous, so we must distinguish cell clones with distinctive Prnp inhibition b) promotor U6 may not be preferred in MEL cell line c) vector may become partially inactivated and finally d) it may be necessary to try more sequences. All these hypothesis are now under investigation. Establishment of stable transfected MEL cell line with inhibited Prnp gene would allow us to test its importance in erythroid differentiation under physiological conditions and also under model conditions of prion infection.

POKLES MNOŽSTVÍ MITOCHONDRIÁLNÍ DNA V LEUKOCYTECH PUPEČNÍKOVÉ KRVE V PRŮBĚHU GESTACE

Autoři: Martina Pejznochová, 3. roč., M. Tesařová, T. Honzík, H. Hansíková, M. Magner a J. Zeman

Školitelé: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc. a RNDr. Hana Hansíková, Ph.D., Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Úvod: Mitochondriální DNA (mtDNA) je cirkulární dvouřetězcová molekula kódující 13 proteinů, které jsou součástí systému oxidativní fosforylace (OXPHOS). Proces jeho maturace během fetálního vývoje není dosud zcela objasněn, přičemž bylo zjištěno, že množství mtDNA v buňce může ovlivnit fetální vývoj. Cílem této studie bylo kvantifikovat změny v množství mtDNA v leukocytech pupečnickové krve v průběhu fetálního vývoje.

Materiál a metody: Byl nasbíráán soubor 107 vzorků pupečníkové krve, které byly odebrány z placentární části pupečníku po porodu donošených a nedonošených novorozenců, kteří se narodili mezi 25. a 41. týdnem gestace. Leukocytární DNA byla izolována metodou selektivní lyze erytrocytů. Kvantifikace mtDNA byla provedena metodou kvantitativní PCR.

Výsledky: Byla zavedena metoda real-time PCR pro relativní kvantifikaci změn v množství mtDNA v leukocytech pupečníkové krve. Významná negativní korelace byla zjištěna mezi poměrem Ct (mtDNA) / Ct (nDNA) v leukocytech pupečníkové krve a gestačním věkem v průběhu fetálního vývoje ($r = -0,54$; $p < 0,01$).

Závěr: Zjištěná negativní korelace svědčí o poklesu relativního množství mtDNA připadajícího na buňku v leukocytech pupečníkové krve v průběhu posledních 13 týdnů gestace. Tento trend může být způsoben rostoucím množstvím leukocytů a změnami jejich buněčných parametrů v souvislosti s probíhajícím přesunem hematopoese z fetálních jater do kostní dřeně.

Tato práce byla podpořena grantem GAČR 303/03/H065.

NOVÉ MUTACE V GENU PRO KOPROPORFYRINOGENOXIDÁZU

Autor: Mgr. Jana Procházková, 4. roč.

Školitel: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Úvod: Hereditární koproporfyrurie (HC) je autozomálně dominantně děděné onemocnění způsobené snížením aktivity enzymu koproporfyrinogenoxidázy (CPO), šestého enzymu metabolické dráhy syntézy hemu. Hlavními klinickými symptomy akutních atak jsou křečovitá bolest břicha, zvracení, nevolnost, tachykardie, zácpa, křeče, deprese, parézy končetin. Gen pro CPO je lokalizován na 3. chromozomu (3q12) blízko centromery. Gen je složen ze sedmi exonů a šesti intronů, zaujímá asi 14 kilobází. V lidském genomu je CPO gen zastoupen jen jednou, má dva polyadenylační signály. Protein CPO je aktivní jako dimer a má téměř globulární tvar. CPO protein o monomerní velikosti 39 kD je složen ze dvou domén.

Metodika: Byla izolována genomická DNA u 2 nemocných s klinicky a biochemicky stanovenou diagnosou HC a jedné nemocné s podezřením na HC. Mutační analýza CPO genu byla prováděna metodami založenými na PCR, amplifikované fragmenty byly sekvenovány nebo štěpeny restriktivními endonukleázami.

Výsledky: Diagnosu hereditární koproporfyrurie jsme na základě přítomnosti mutace v genu pro CPO potvrdili u všech tří vyšetřovaných. Dvě nalezené mutace jsou v literatuře dosud nepopsané. U prvního nemocného mutace vedla k záměně kodonu pro Trp27 za STOP kodon a k předčasně ukončené translaci. U druhého nemocného jsme prokázali mutaci podmiňující záměnu aminokyseliny Phe377 za Leu. Deleci tří bazí při zachování čtecího rámce, která vede k deleci Gly390, jsme našli u další nemocné s Gilbertovým syndromem a akutní porfyrickou atakou v anamnéze.

Závěr: Znalost konkrétní mutace charakteristické pro danou rodinu s HC umožní odhalení všech nositelů patologické mutace a umožní prevenci akutních porfyrických atak. Expres a charakterizace mutované CPO umožní hlubší pochopení molekulární patologie HC.

Podpořeno granty GAČR/303/03/H065, MŠMT 0021620806.

INHIBITORY EFFECTS OF α -LIPOIC ACID ON THE GROWTH OF VACCINIA VIRUS

Authors: Martina Spišáková, 5. roč., Zdeněk Čížek, Zora Mělková

Supervisor: MUDr. Zora Mělková, Ph.D., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Vaccinia virus (VV), a typical member of the Poxvirus family, has been used in the past for vaccination against smallpox, leading to eradication of this disease by 1980. Nevertheless, understanding the processes underlying VV infection is increasingly more important for various reasons, namely for vaccination purposes and for defense against potential bioterrorist attacks.

We have previously observed inhibitory effects of ethacrynic acid, a redox-modulating agent, on VV growth. Consequently, we studied changes in the growth of VV after treatment with a panel of several other redox-modulating agents: L-ascorbic acid, dithiothreitol, β -mercaptoethanol and α -lipoic acid (LA), with LA being the only effective agent. We observed a decrease in the growth of VV and in luciferase activity expressed by VV with increasing concentrations of LA (250 μ M, 500 μ M and 1 mM). This inhibitory effect could be observed in different cell types – epithelial cell lines HeLa G and BSC-40, fibroblasts L929, and in macrophages J774.G8.

Consequently, we characterized the step in VV growth cycle that is inhibited by LA. We inhibited VV DNA replication by cytosine arabinoside and analyzed activity of luciferase expressed by VV recombinants under control of VV early/late or late promoters. Activity of luciferase under the late promoter was inhibited by LA, suggesting that LA inhibits VV DNA synthesis or expression of viral late proteins. The effect of LA on VV DNA synthesis is currently being analyzed using quantitative real-time PCR.

Understanding the mechanism of LA-mediated inhibition of VV growth is important for future design of new anti-VV agents.

SHRNA-MEDIATED KNOCKDOWN OF HUMAN OXA1L IN HEK293 CELLS

Authors: Lukáš Stibůrek, 4. roč., Daniela Fornůsková, Laszlo Wenchich, Hana Hansiková and Jiří Zeman
Supervisor: prof. MUDr. Jiří Zeman DrSc., Department of Pediatrics and Center of Applied Genomics, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine

The Oxa1 translocase was identified in fungi as a crucial component of the inner mitochondrial membrane export machinery that mediates the insertion of both mitochondrially and nuclear encoded proteins into the inner membrane from the mitochondrial matrix. The predicted human homologue, Oxa1l, was originally identified by partial functional complementation of the respiratory growth defect of yeast oxa1 mutant. Here we demonstrate that both the endogenous human Oxa1l, with an apparent molecular mass of 42 kDa, and the Oxa1l-FLAG chimeric protein localize exclusively to mitochondria in HEK293 cells. Furthermore, human Oxa1l was found resistant to alkaline carbonate extraction, and using two-dimensional blue native/denaturing PAGE, the majority of the protein was identified as part of a 600-700 kDa complex that co-migrated with the ATP synthase holoenzyme. The stable shRNA-mediated knockdown of Oxa1l in HEK293 cells resulted in markedly decreased steady-state levels and ATP hydrolytic activity of the F_1F_0 -ATP synthase and moderately reduced levels and activity of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Taken together, our results indicate that human Oxa1l represents a mitochondrial integral membrane protein required for biogenesis of the F_1F_0 -ATP synthase and NADH:ubiquinone oxidoreductase complexes.

PRAVIDELNÁ AEROBNÍ FYZICKÁ AKTIVITA OVLIVŇUJE LIPIDOVÝ PROFIL VE SLEDOVANÉM SOUBORU

Autoři: Zuzana Stránská¹, 2. roč., Martin Matoulek¹, Petr Fábín², Zdeněk Vilikus²
Školitel: prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA^{1,2} III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN, ² Ústav tělovýchovného lékařství 1. LF UK a VFN

Úvod: Existují práce, které dokládají, že pohybová aktivita přispívá ke zlepšení lipidového profilu sledovaných osob, ale musí být provozovaná pravidelně a dostatečně dlouho.

Cíle: Porovnání změn v hladinách celkového cholesterolu (C-CH), LDL-cholesterolu (LDL-C), HDL-cholesterolu (HDL-C), ateroindezu (AI) a triglyceridů (TG) ve sledované skupině na začátku a po skončení řízené fyzické zátěže.

Metodika: 25 netrénovaných dobrovolníků (18 žen a 7 mužů) s BMI nad 25 kg/m² odvíčilo za 3 měsíce 36 hodin, z toho minimálně 24 hodin pod dohledem školeného instruktora v Rekondičním centru VŠTJ Medicina Praha. Vylučovací kritéria: současná pohybová aktivita více než dvakrát týdně, nekontrovaná arteriální hypertenze, léky ovlivňující srdeční frekvenci, manifestní ICHS, onemocnění vylučující doporučenou pohybovou aktivitu a agresivní redukce v posledních 2 letech. Nebyly hodnoceny subjekty s více než týdenní přestávkou v programu.

Výsledky:		IS 95		IS 95	Významnost
C-CH_1	4,93	0,83	4,87	0,89	
C-CH_2	4,81	0,82	4,76	0,85	NS
HDL-C_1	1,25	0,33	1,29	0,33	
HDL-C_2	1,35	0,29	1,28	0,31	$\alpha < 0,05; \beta < 0,2$
LDL-C_1	3,02	0,68	2,95	0,78	
LDL-C_2	2,87	0,68	2,87	0,57	NS
AI_1	3,13	0,9	3	2,5	
AI_2	2,7	0,75	2,4	0,9	$\alpha < 0,05; \beta < 0,2$
TG_1	1,47	0,59	1,33	0,51	
TG_2	1,17	0,45	0,92	0,6	$\alpha < 0,05; \beta < 0,2$

C-CH–celkový cholesterol, HDL-C – HDL cholesterol, LDL-C – LDL cholesterol, AI – ateroindeks, TG – triglyceridy, číslo 1 za označením proměnné jsou hodnoty na začátku pokusu, číslo 2 hodnoty po jeho ukončení, –aritmetický průměr, IS 95 – 95% interval spolehlivosti aritmetického průměru, – medián, IS 95 – 95% interval spolehlivosti mediánu; všechny hodnoty jsou v mmol/L. Významnost: NS – rozdíl v hodnotách před cvičením a po něm není významný na 95% hladině významnosti, α –pravděpodobnost chyby I. druhu, β – pravděpodobnost chyby II. druhu

Závěr: Ve sledovaném souboru jsme prokázali na 5% hladině významnosti signifikantní vzestup HDL-C, pokles TG a pokles AI, což dokládá, že aerobní fyzickou aktivitou lze docílit změny lipidogramu v našich podmínkách i u osob s vysokou tělesnou hmotností.

Podpořeno grantem IGA MZ-ČR 8384-3

ANTITUBULINOVÉ PROTILÁTKY U PACIENTŮ S ROZTROUŠENOU SKLERÓZOU STANOVENÉ POMOCÍ DVOU ELISA METOD

Autoři: Jana Švarcová^{1,2}, 3. roč., M. Šteinbachová³, L. Fialová¹, A. Bartoš^{4,5}, I. M. Malbohan^{1,2}
Školitel: doc. MUDr. Ivan M. Malbohan, CSc., Ústav lékařské biochemie 1. LF UK¹ Ústav lékařské biochemie 1. LF UK, ² Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, ³ Vidia s.r.o., Jesenice u Prahy, ⁴ Neurologická klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, ⁵ Psychiatrické centrum 3. LF UK

Cílem studie bylo porovnat hladiny antitubulinových protilátek v mozkomíšním moku (CSF) a séru stanovené pomocí dvou různých ELISA metod. U jedné byl jako antigen použit hovězí tubulin (anti-TUB protilátky), u druhé syntetický oktapeptid specifický pro neuronální tubulin (anti-TUs protilátky).

Antitubulinové protilátky jsme stanovili ve vzorcích séra a mozkomíšního moku 52 pacientů [39 pacientů s roztroušenou sklerózou (MS) a 13 pacientů s jinými neurologickými onemocněními (CD)] a 17 normálních kontrolních jedinců (CN). Ve skupině pacientů s roztroušenou sklerózou i ve skupině pacientů s jinými neurologickými onemocněními byly zjištěny statisticky významně zvýšené hladiny protilátek v mozkomíšním moku ve srovnání s kontrolní skupinou (MS vs CN - anti-TUB $p < 0,005$; anti-TUs $p < 0,0005$; MS vs CD - anti-TUB $p < 0,05$; anti-TUs $p < 0,02$). U sérových antitubulinových protilátek nebyl nalezen rozdíl mezi skupinou MS a CN ani u jedné ELISA metody. V obou skupinách pacientů (MS a CD) a u kontrolních jedinců (CN) byla zjištěna statisticky významná korelace mezi oběma ELISA metodami při vyšetřování protilátek v mozkomíšním moku (MS $r = 0,92$, $p < 0,0001$; CD $r = 0,85$, $p < 0,0001$; CN $r = 0,89$, $p < 0,0001$), zatímco u sérových protilátek korelace nebyla pozorována.

Pomocí obou ELISA metod jsme prokázali zvýšenou hladinu antitubulinových protilátek v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou oproti kontrolním jedincům. Z výsledků dále vyplývá, že populace antitubulinových protilátek v séru se liší od populace protilátek v mozkomíšním moku.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM Patofyziologie neuropsychiatrických onemocnění a její klinické aplikace č. 0021620816.

AKUTNÍ INTERMITENTNÍ PORFYRIE: MOLEKULÁRNĚ BIOCHEMICKÁ STUDIE

Autor: Mgr. Dana Ulbrichová, 4. roč.
Školitel: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Mutace v genech kódujících proteiny biosyntetické dráhy hemu vedou k poruchám nazývaným porfyrie. Porfyrie jsou skupinou většinou vrozených poruch, které dělíme na jaterní a erythropoetické, a podle klinické manifestace na akutní a chronické. Mezi akutní jaterní porfyrie se řadí akutní intermitentní porfyrie (AIP), porfyria variegata (PV), hereditární koproporfyrie (HCP) a velmi raritní porfyrie s defektem ALA-D (ALAD-P).

AIP (OMIM 176000) je autozomálně dominantně děděné onemocnění, jehož příčinou je částečné snížení aktivity porfobilinogen deaminázy (PBGD, EC 4.3.1.8), třetího enzymu biosyntetické dráhy. Projevuje se akutními atakami (symptomatologie abdominální, neurologická, psychiatrická), které mohou být vyvolány řadou faktorů. Vzhledem k tomu, že mezi spouštěcí faktory patří i léky (např. barbituráty, sulfonamidy), jsou akutní jaterní porfyrie klasifikovány jako onemocnění farmakogenetická. Přibližně 10 % postižených vykazuje velice různorodé klinické projevy, u zbývajících 90 % se porucha vyskytuje v latentní formě.

Ve spolupráci s klinickými genetiky jsme analyzovali DNA nově diagnostikovaných nemocných s AIP a jejich rodinných příslušníků. Molekulární diagnostika byla prováděna pomocí PCR, DGGE a DNA sekvenování. Bylo objeveno devět mutací v genu pro PBGD, z toho čtyři nové (610 C>A, 675 delA, 750 A>T, 966 insA) a pět již popsanych (76 C>T, 77 G>A, 518 G>A, 771+1 G>T, 973 insG). V rámci studia vlivu nově objevených mutací v genu na strukturu proteinu (korelace genotyp/fenotyp) jsme exprimovali konstrukty se zvolenými mutacemi v E. coli a provedli enzymologické studie. Studium vlivu mutací na strukturu a funkci proteinu přináší důležité informace o molekulární podstatě onemocnění. Určení mutací a jejich nositelů v jednotlivých rodinách s AIP je důležité pro prevenci akutních atak a rovněž pro genetické poradenství.

Podpora grantem MŠMT 0021620806.

ZVÝŠENÍ ÚČINKU FOTODYNAMICKÉ TERAPIE NA BASOCELULÁRNÍ KARCINOM SYNCHRONNÍ APLIKACÍ PULZNÍHO BARVIVOVÉHO LASERU

Autor: MUDr. Marek Vlk, 3. roč.
Školitel: prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc., as. MUDr. Roman Šmucler, CSc., Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Fotodynamická terapie (dále PDT), která je současnou onkologií uznávanou alternativní metodou v léčbě superficiálního basaliomu (dále BCC) kůže, je založená na selektivní nekrotizaci tumoru chemickou reakcí fotosenzibilizátoru po světelné expozici. Abychom dosáhli stejných výhod (zejména estetického výsledku léčby) i u nodulárního basaliomu, je třeba zvýšit účinnost metody. Pokusili jsme se toho dosáhnout simultánní aplikací pulzního barvivového laseru (dále PDL), který kromě aktivace PDT by měl fotoselektivně koagulovat a destruovat tumor.



Metodika: Jedná se o prospektivní studii. Terapeutický protokol se zahajuje skarifikací kůže v oblasti ložiska BCC, čímž se zvyšuje průnik fotosenzibilizátoru k nádorovým buňkám. Poté se nanáší v tenké vrstvě fotosenzibilizátor ve formě masti (methylester kys. aminolevulové- přípravek Metvix). Nutná je tříhodinová okluze k zajištění dostatečné penetrace. Dále aktivujeme senzibilizátor v metodě A červeným světlem (Omnilux, vlnová délka 635 nm a výkon 4 W) po dobu 20 minut, v metodě B pak PDL (ScleroPlus, Candela, 20Jcm⁻²).

Výsledky: Do studie bylo zahrnuto celkem 31 pacientů, věkový průměr činil 62,5 roku. U pacientů se recidiva objevila při užití metody A po 1 měsíci ve 28,6 %, po 6 měsících u 7 % a po 12 měsících ve 28,6 %, při užití metody B po 1 měsíci v 5,9 %, po 6 měsících žádná a po 12 měsících v 11,8 %. Subjektivní hodnocení obou metod bylo pacienty vnímáno bez statisticky signifikantního rozdílu.

Závěr: Aktivace PDT pomocí PDL je efektivnější ($p < 0,05$) i když teoreticky by tomu mělo být naopak. Projevuje se pravděpodobně synergický efekt fotokoagulace nutričních cév. Tato pilotní studie je světově prioritní a proto nyní probíhá multicentrická verifikace k zjištění dlouhodobých výsledků. Samotná PDT je pro BCC málo účinná oproti jiným metodám, kombinace poskytuje efektivitu jiných metod s výborným estetickým účinkem.

STUDY OF URINARY PROTEOMES IN PATIENTS WITH NEPHROTIC SYNDROME BY 2D TECHNIQUE

Author: Lucie Vojtová, 3. roč.

Supervisor: prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Background. The urinary protein in healthy people does not exceed 150 mg/day and its increase above 250 mg/day indicates kidney damage. Proteinuria higher than 3,5 g/ 24h is typical for the nephrotic syndrome, usually indicating severe primary or secondary glomerular damage and also plays roles in progression of renal diseases. Thirty urine samples of patients with nephrotic syndrome and other diagnoses were analyzed by 2D electrophoresis method. The study was focused on 2D technique optimization, comparison of the urinary proteomes and on identification of the specific proteins.

Methods. The proteins were divided by isoelectric focusing method using polyacrylamide strips (pH 3-10 linear). The second dimensional SDS electrophoresis was performed in 12 % polyacrylamide gel. The proteins were visualized by silver method and selected proteins were identified by MALDI-TOF MS.

Results. We found out that without adding protease inhibitors we can detect proteolysis, with increased quantity of proteins manifested in the area about 10 kDa and decreased quantity of proteins detectable in the area with molecular weights about 50 kDa. We evaluated that protease inhibitors (serine, cysteine, aminopeptidase) block the changes of urinary proteins and samples are then suitable for 2D electrophoresis and following proteomic analysis. The urinary maps comparison brought out that there are significant proteins' changes, which are typical for Fabry's disease and other nephropathies. Also albumin, transferrin, alpha-1 antitrypsin and transthyretin precursor were identified by MALDI-TOF MS.

Conclusions. Changes of urinary proteins should be important for renal diagnosis and progression.

MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA RETTOVA SYNDROMU

Autor: Mgr. Daniela Záhoráková, 5. roč.

Školitel: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Úvod: Rettův syndrom je jednou z nejčastějších příčin mentální retardace a vývojového regresu u dívek. Většina případů je způsobena de novo mutacemi v X-vázaném MECP2 genu. Jeho produktem je metyl-CpG vazební protein 2, který plní důležitou funkci v regulaci genové exprese a chromatinové struktury. Cílem naší práce byla mutační analýza MECP2 genu u pacientek s klinickou diagnózou Rettova syndromu a dále studium vztahu mezi genotypem a fenotypem.

Metodika: Vycházeli jsme ze souboru 87 pacientek s klinicky stanovenou diagnózou Rettova syndromu. Metodou přímého DNA sekvenování jsme provedli analýzu celé kódující sekvence a přilehlých nekódujících oblastí MECP2 genu. Nalezené mutace byly potvrzeny pomocí RFLP. Rozsáhlé delece/duplikace v MECP2 genu byly analyzovány metodou MLPA. Vypracovali jsme dotazník o klinických projevech a průběhu onemocnění a zaslali ho rodičům pacientek s potvrzenou kauzální mutací. Hodnotili jsme zejména počátek regrese, postižení řeči, jemné motoriky, chůze a celkový klinický obraz (přítomnost základních a podpůrných kritérií Rettova syndromu).

Výsledky: Mutační analýzou MECP2 genu jsme identifikovali kauzální mutaci u 68 pacientek. 8 mutací bylo nových (6 z nich jsme nedávno publikovali). Při studium korelace mezi genotypem a fenotypem jsme pozorovali obecně mírnější příznaky onemocnění u pacientek s missense mutacemi ve srovnání s pacientkami, které mají vlivem nonsense mutací a delecí postiženou jednu nebo obě funkční domény MeCP2 proteinu.

Závěr: Identifikace genetické příčiny Rettova syndromu přinesla možnost časného a přesného určení diagnózy a možnost genetického poradenství v postižených rodinách. Klinicky stanovenou diagnózu Rettova syndromu jsme definitivně potvrdili na molekulární úrovni u 68 pacientek. Analýza genotyp vs. fenotyp prokázala, že závažnost klinických příznaků částečně koreluje s typem a lokalizací kauzální mutace.

Práce vznikla s podporou projektu IGA 8355-3.

PROTEKTIVNÍ EFEKT U MYŠÍ PO ADJUVANTNÍ INTRATRACHEÁLNÍ IMUNIZACI INAKTIVOVANÝM VIREM CHŘIPKY TYPU A

Autoři: Peter Zanvit, 6. roč., Martina Havlíčková, Marie Jirkovská, Ivan Šterzl, Ludmila Prokešová
Školitelka: doc. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Chřipkové vakcíny používané v současné době nenavozují dostatečnou křížovou protekci. Jako více efektivní se jeví slizniční imunizace inaktivovaným chřipkovým virem. Aplikace samotného viru je ale často málo efektivní v navození dostatečné imunitní odpovědi, proto jsme kladli důraz na zesílení imunitní odpovědi pomocí adjuvans. Jako adjuvans jsme použili G+ nepatogenní bakterii *Bacillus firmus*, u které byly prokázány výrazné imunostimulační vlastnosti.

Metodika: BALB/c myši byly imunizovány intratracheálně, formaldehydem inaktivovanými viry chřipky typu A (A/PR/8/34 (H1N1) a A/California/7/04 (H3N2)). Jako adjuvans byla použita delipidovaná forma *Bacillus firmus* (DBF). Produkce protilátek byla detekována metodou ELISA. Lokální projevy imunizace v plicích byly sledovány histologicky. Dále byla sledována exprese cytokinů v plicích pomocí metody qRT-PCR. Protektivní efekt imunizace byl ověřen experimentem *in vivo*.

Výsledky: Po imunizaci samotným virem chřipky A docházelo k navození dostatečné imunitní odpovědi, ale po použití adjuvans byla tato odpověď výrazně zvýšena. Intratracheální imunizace indukuje tvorbu vysokých hladin slizničních protilátek třídy IgA a také IgG v dolních cestách dýchacích. Při infekčním pokusu *in vivo* byla prokázána výrazná křížová protekce mezi subtypy chřipky A.

Závěr: DBF je účinné adjuvans pro imunizaci myši inaktivovaným chřipkovým virem cestou respiračního traktu. Výsledná imunitní odpověď měla protektivní charakter a byla prokázána i křížová protekce.

Tato práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 0021620806 a Grantové agentury ČR 310/07/0675.

STANOVENÍ BILIRUBINU VE TKÁNÍCH A TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH

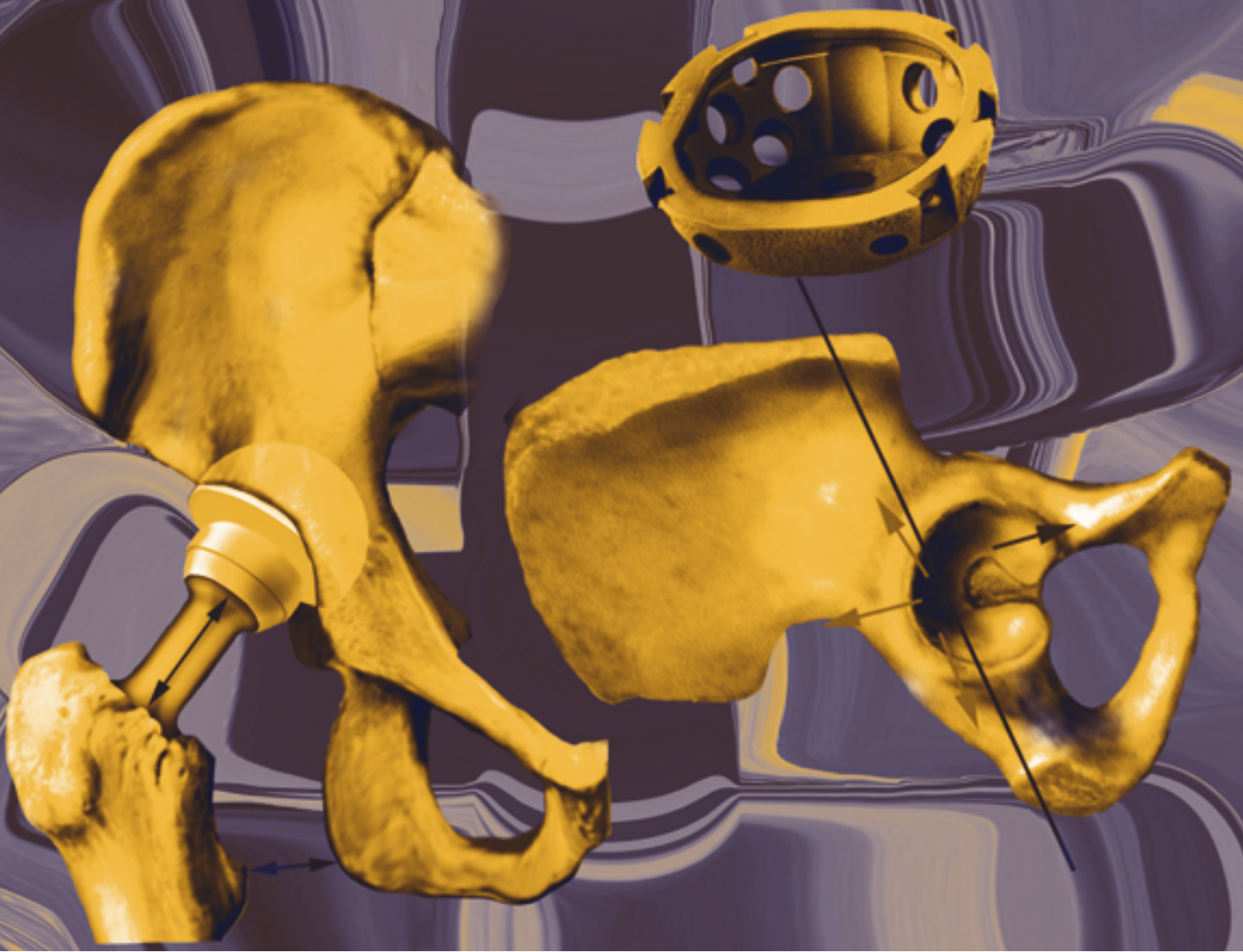
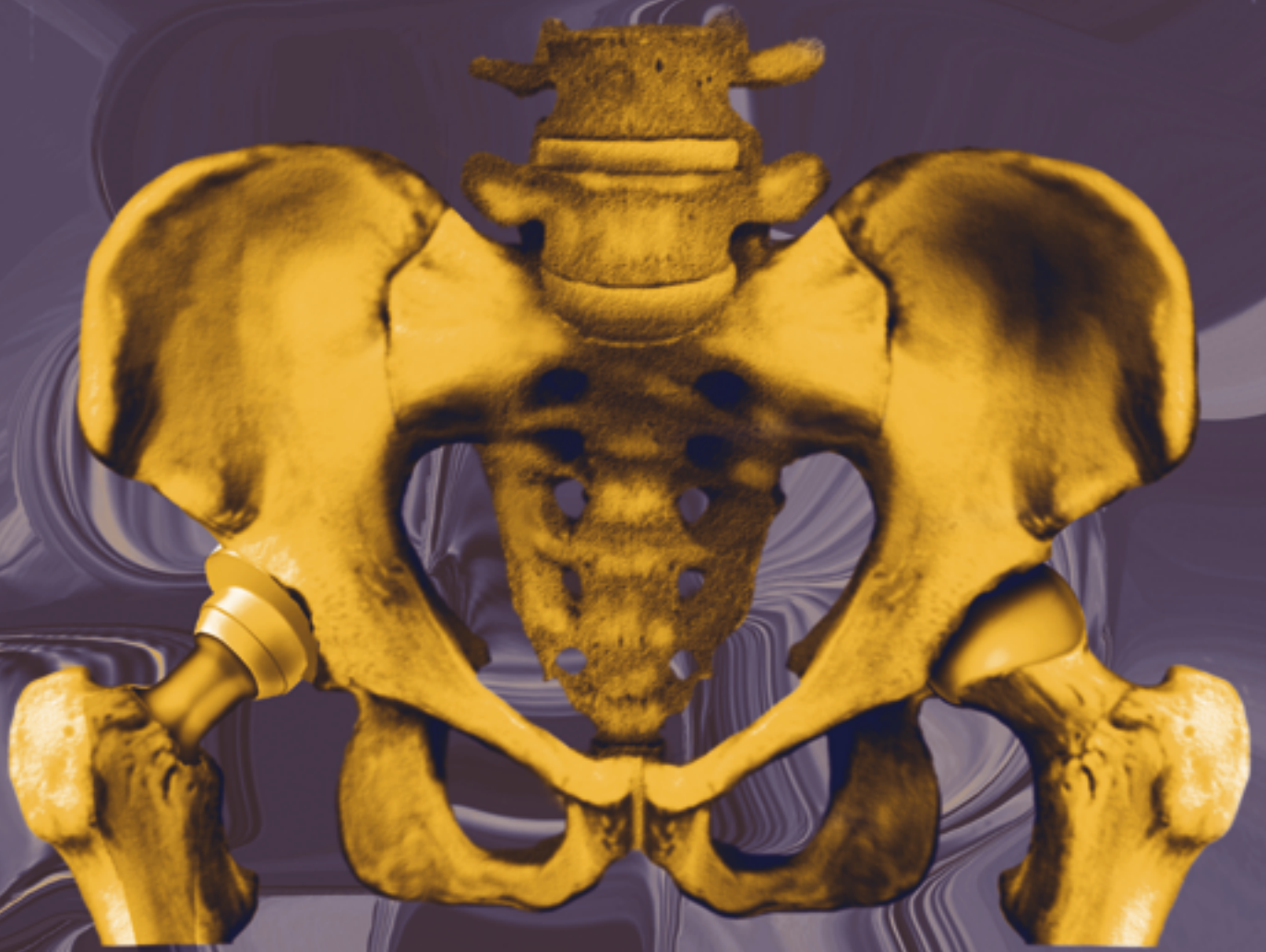
Autoři: Jaroslav Zelenka, 3. roč., Martin Leníček, Marie Zadinová, Donald Ostrow, Libor Vítek
Školitel: doc. MUDr. Libor Vítek, Ph.D., MBA, Hepatologická laboratoř, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Bilirubin je hlavní produkt odbourávání hemu v lidském organismu vykazující antioxidační, antiproliferační a cytoprotektivní účinky při fyziologických koncentracích, ale způsobující novorozeneckou encefalopatii za patologických podmínek. Studium dynamiky metabolismu bilirubinu na úrovni buněk a tkání je významné především pro pochopení mechanismu vzniku civilizačních chorob, je však komplikováno malou stabilitou bilirubinu, a proto dosud neexistuje vhodná metodika. Cílem naší práce bylo vyvinout analytickou metodu umožňující stanovení bilirubinu ve tkáních a tkáňových kulturách.

Metodika: Pro experiment byli použiti samci potkanů kmene Gunn s vrozenou těžkou nekonjugovanou hyperbilirubinemií a jako kontroly jejich heterozygotní sourozenci s normálními hladinami bilirubinu. Zvířata byla v anestezii zbavena krve a jejich orgány byly zmrazeny v dusíku. Při analýze byl přidán mesobilirubin jako vnitřní standard, tkáň zhomogenizována a bilirubin byl extrahován směsí rozpouštědel. Vzorek byl analyzován pomocí HPLC s reverzní fází a detekcí absorbance při 440 nm. Bilirubin byl kvantifikován pomocí kalibrační křivky vytvořené metodou standardního přídatku.

Výsledky: Byl vyvinut postup extrakce bilirubinu z tkání, který minimalizuje jeho degradaci, a přitom je kompatibilní s kvantitativním stanovením na HPLC. Zároveň byla adaptována HPLC metoda pro stanovení bilirubinu v séru tak, aby byla maximalizována její citlivost a byla rutinně použitelná. Novou metodou se podařilo kvantifikovat bilirubin ve všech studovaných orgánech včetně jater a mozku a hodnoty z hyperbilirubinemických zvířat souhlasily s hodnotami dříve publikovanými.

Diskuse: Podařilo se vyvinout novou analytickou metodu umožňující kvantifikovat bilirubin ve tkáních a tkáňových kulturách. Ve srovnání s dosud používanými přístupy, které byly použitelné pouze pro analýzu tkání za podmínek těžké hyperbilirubinemie, je její výhodou především vysoká specifita a citlivost umožňující použít pouhých 20 mg normobilirubinemické tkáně. Metoda je dostatečně přesná a správná, aby mohla být použita pro studium závislosti produkce a distribuce bilirubinu na biologických podmínkách.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ POSTERY

ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY

- Bálková Štěpánka, MUDr., 3. r.
- Beran Ondřej, MUDr., 5. r.
- Biroš Ernest, MUDr., 1. r.
- Burda Pavel, Mgr., 1. r.
- Bošanská Lenka, MUDr., 2. r.
- Čada Zdeněk, MUDr., 2. r.
- Červená Irena, MUDr., 3. r.
- Čížek Zdeněk, MUDr., 5. r.
- Duffková Ladislava, MUDr., 2. r.
- Dušek Petr, MUDr., 4. r.
- Fabiánová Jana, MUDr., 4. r.
- Fojtíková Markéta, MUDr., 2. r.
- Habara Petr, MUDr., 1. r.
- Havránková Petra, MUDr., 4. r.
- Hnízda Aleš, Ing., 1. r.
- Hrdý Jiří, 1. roč.
- Jirman Radek, MUDr, Ing., 8. r.
- Kasperová Martina, MUDr., 3. r.
- Klíščíková Jarmila, MUDr., 2. r.
- Kmoch Vladimír, MUDr., 3. r.
- Kodydková Jana, Mgr., 1. r.
- Kopecká Jana, Ing., 1. r.
- Kopečková Marta, Mgr., 1. r.
- Králík Lubomír, Mgr., 1. r.
- Krupička Jan, MUDr., 2. r.
- Křenová Martina, Mgr., 5. r.
- Lišková Jana, Mgr., 7. r.
- Lišková Petra, MUDr., 7. r.
- Mráz Miloš, MUDr., 1. r.
- Oganessian Edgar, MUDr., 3. r.
- Roubíček Tomáš, MUDr., 1. r.
- Šzakácsová Monika, 2. r.
- Špaček Miroslav, MUDr., 2. r.
- Štěpánková Lenka, MUDr., 2. r.
- Tajtlová Jana, Mgr., 2. r.
- Tuková Jana, MUDr., 2. r.
- Vargová Karina, Mgr., 1. r.
- Vávrová Lucie, Mgr., 1. r.
- Volná Jana, MUDr., 4. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

- předseda:** prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.
členové: doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.
doc. MUDr. Pavel Maruna, CSc.



VLIV SOCIOEKONOMICKÉHO POSTAVENÍ NA STAV ORÁLNÍHO ZDRAVÍ MLADISTVÝCH A DOSPĚLÝCH

Autoři: Štěpánka Bálková, Lubor Mrklas, Zdeněk Broukal

Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc., Výzkumný ústav stomatologický 1. LF UK a VFN

Řada zahraničních studií prokázala, že se socioekonomické postavení (SES) jedinců významně odráží ve stavu jejich orálního zdraví. Cílem studie bylo ověřit tento vztah na populaci mladistvých a dospělých České republiky. Metodika. V celostátním šetření v roce 2006 bylo vyšetřeno 5769 18letých a 38998 35-44letých. Rozdělení vyšetřených podle SES: 18letí – studující – pracující, 35-44letí – 10 skupin (International Standard Classification of Occupations (ISCO-88) – 1. Vedoucí pracovníci, 2. odborní duševní pracovníci, 3. techničtí, zdravotničtí a pedagogičtí pracovníci, 4. nižší administrativní pracovníci, 5. provozní pracovníci, 6. kvalifikovaní zemědělské dělníci, 7. řemeslníci a kvalifikovaní dělníci, 8. obsluha strojů a zařízení, 9. pomocní a nekvalifikovaní pracovníci a 10. nepracující. Standardní ukazatele orálního zdraví jako kazivost, stav parodontu a potřeba ošetření byly propočítány pro každou skupinu. Signifikace rozdílů - Student t test a Fischerův test ($P=0,05$). Výsledky. 18letí – pracující vs. studující: průměr KPE 8.30 vs. 6.82 ($P<0,05$), CPI=3 (%) - 2.6 vs. 0.7 ($P<0,05$). 35-44letí: průměr KPE 17.91 – ISCO-88 skupiny 1.-3. (16.81, 16.29 resp.17.31) nižší, skupiny 4.-18. (16, 5. – 18.14, 6. – 19.04, 9. – 20.17 a 10. – 18.61) vyšší ($P<0,05$). Prevalence počínající parodontitidy (CPI=3) činila 16.1 procent (skupiny 1.-4. - 14.8, 13.2, 13.4 resp.14.9, skupiny 6. -9. - 19.4, 18.2, 17.9 resp. 22.0) ($P<0,05$). Prevalence pokročilé parodontitidy (CPI=4) činila 3.3 procent (skupiny 2.-4. – nižší, skupiny 6 -9. – vyšší) ($P<0,05$). Závěr. Stav chrupu a parodontu byl významně horší a potřeba ošetření vyšší u skupin s nižším SES (ISCO-88). Preventivní opatření a programy podpory zdraví by proto měly být adresovány zejména populačním skupinám v nižším SES postavení.

Grant IGA MZ ČR č.NR/8331-3.

HLADINA KORTISOLU V MOZKOMÍŠNÍM MOKU SOUVISÍ S ETIOLOGIÍ A TÍŽÍ PRŮBĚHU INFEKČNÍ MENINGITIDY

Autoři: Ondřej Beran, Jarmila Hnyková, Olga Džupová, Michal Holub

Školitel: doc. MUDr. Michal Holub, Ph.D., III. klinika infekčních a tropických nemocí 1. LF UK a FN Na Bulovce

Úvod. Navzdory pokrokům v antibiotické terapii je bakteriální meningitida (BM) onemocněním s významnou morbiditou a mortalitou. Klinický průběh a komplikace BM mohou být příznivě ovlivněny imunomodulační léčbou glukokortikoidy, nicméně dosud nebyl studován význam endogenního intratekálního kortisolu při zánětlivé odpovědi v subarachnoideálním prostoru. Záměrem studie byla analýza závislosti hladin kortisolu v likvoru i periferní krvi na produkci zánětlivých cytokinů u pacientů s BM a posouzení vztahu těchto mediátorů ke klinickému průběhu BM. Rovněž byla stanovena využitelnost měření kortisolu v likvoru v diferenciální diagnostice BM a aseptické meningitidy (AM). **Metodika.** Do studie bylo zařazeno 47 pacientů s BM, 37 pacientů s AM a 13 kontrolních osob. V likvoru a séru byly kromě rutinních parametrů stanoveny koncentrace kortisolu, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 a TNF- α .

Výsledky. Průměrná koncentrace kortisolu v likvoru u pacientů s BM byla 133 \pm 26 nmol/l. Hladina kortisolu v likvoru pozitivně korelovala s jeho sérovou koncentrací ($r = 0,587$, $p < 0,001$). Dále byl prokázán vztah intratekálního kortisolu ke klinickému skóre APACHE II ($r = 0,763$, $p < 0,001$), SOFA ($r = 0,65$, $p < 0,001$) a GCS ($r = -0,547$, $p = 0,001$). Naopak v případě koncentrací cytokinů v likvoru ani v séru nebyla prokázána jejich korelace s tíží průběhu. Hladina kortisolu v likvoru u pacientů s AM byla významně nižší oproti BM ($p < 0,001$). Statistickou analýzou byla zjištěna koncentrace 46,1 nmol/l jako optimální hraniční hodnota pro diagnózu BM se senzitivitou 82 % a specificitou 100 %.

Závěr. Koncentrace intratekálního kortisolu u pacientů s BM je velmi zvýšena a souvisí, na rozdíl od hladin zánětlivých cytokinů, s tíží průběhu onemocnění. Naše výsledky rovněž prokazují, že by stanovení kortisolu v likvoru mohlo sloužit jako další užitečný biomarker v rozlišení BM a AM.

Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. 8014-3, grantem GAČR č. 10/05/H533 a výzkumným záměrem MŠMT ČR č. 0021620806.

MOŽNOSTI VYUŽITÍ PROTEOMICKÉ ANALÝZY K VČASNÉ DETEKCI KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Autor: MUDr. Ernest Bíroš, I. chirurgická klinika – břišní, hrudní a úrazová chirurgie 1. LF UK a VFN

Školitel: prof. MUDr. Emanuel Nečas DrSc., Ústav patologické fyziologie 1. LF UK

Úvod: Lidský proteom, tedy součet všech proteinů lidského těla, je odhadován na 500 000 bílkovin. Velká většina těchto proteinů je zatím neprobádaná, podobně jako vztah exprese bílkovin séra k jednotlivým patologickým stavům. Teprve zdokonalení hmotnostní spektrometrie k identifikaci proteinů na konci 90.let minulého století umožnilo detailní výzkum proteomu v širokém měřítku. Aplikace metodik hmotností spektrometrie k výzkumu proteomu (proteomická analýza) je nadějná cesta k nalezení nových neinvazivních onkomarkerů s tolik očekávanou specificitou a senzitivitou pro jednotlivá onkologická onemocnění včetně kolorektálního karcinomu (CRC).

Metodika: Použitím hmotnostní spektrometrie typu MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) společně s mikrochromatografickou separací séra typu CLINPROT se pokusíme detekovat rozdíly v proteinovém složení séra zdravých jedinců a pacientů s kolorektálním karcinomem. Získané rozdíly v proteinovém

složení – tzv. proteinové píky – podrobíme dalšímu testování a identifikaci ve snaze potvrdit jejich senzitivitu a specificitu pro onemocnění kolorektálním karcinomem.

Výsledky: Metoda Clinprot MALDI-TOF-MS se vyznačuje vysokou citlivostí (schopností detekce proteinů a peptidů v řádech femtomolů) a kapacitou – tedy schopností zpracování několika desítek vzorků najednou. Z toho důvodu t.č. probíhá teprve sběr klinických vzorků jednak od pacientů s CRC, dále od pacientů s benigní kolorektální patologií a v neposlední řadě taky od zdravých jedinců s potvrzeným negativním pankolonoskopickým nálezem. Teprve po získání dostatečného množství vzorků provedeme vlastní analýzu s použitím výše jmenované metody.

Závěr: Naš projekt není t.č. ve stadiu hodnocení výsledků. Práce zahraničních autorů s použitím proteomického profilování u ovariálního karcinomu, karcinomu pankreatu a jiných malignit však již přinesly povzbudivé výsledky s objevem nových proteinových nádor-specifických profilů a onkomarkerů. Věříme, že naším výzkumem na poli proteomického profilování u CRC nalezneme sérové biomarkery, které budou vykazovat superioritu nad soudobými neinvazivními diagnostickými testy a umožní dřívější diagnostiku tohoto v české populaci velice rozšířeného maligního onemocnění.

VLIV NÍZKOKALORICKÉ DIETY NA SÉROVÉ KONCENTRACE A EXPRESI CYTOADHEZIVNÍCH MOLEKUL V TUKOVÉ TKÁNI U OBÉZNÍCH ŽEN

Autoři: Lenka Bošanská, Lacinová Z., Doležalová R., Dolinková, M., Mráz M., Roubíček T., Křemen M., Haluzíková D., Matoulek M.

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

Úvod: Cytoadhezivní molekuly (CAM), proteiny exprimované na povrchu endotelových buněk, se účastní iniciálních fází rozvoje endoteliální dysfunkce. Vyšší hladiny solubilních CAM byly zaznamenány u pacientů s aterosklerózou nebo diabetiků 2.typu. Cílem naší práce bylo stanovit cirkulující koncentrace a mRNA expresi ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) a E-selektinu v subkutánní tukové tkáni obézních žen a vyhodnotit vliv 3-týdenní nízkokalorické diety na vybrané parametry. **Metodika:** Do studie bylo zařazeno 12 obézních žen (BMI 45,7±6,7) a 12 štíhlých zdravých žen (BMI 24±4,3). Genová exprese CAM v subkutánní tukové tkáni byla stanovena metodou RT-PCR, sérové koncentrace CAM multiplexovou imunoanalýzou.

Výsledky: Cirkulující koncentrace sICAM-1 a E-selektinu byly vstupně vyšší u obézních pacientek proti zdravým kontrolám (138,3±71,99 vs. 77,79±28,6 ng/ml; 23,74±10,81 vs. 9,13±4,7 ng/ml, p<0,05). Po 3-týdenním podávání nízkokalorické diety obézním pacientkám došlo k signifikantnímu poklesu BMI a koncentrace E-selektinu. Expresí mRNA pro E-selektin v subkutánní tukové tkáni byla vstupně nižší u obézních žen proti kontrolní skupině. Po dietě došlo ke zvýšení exprese mRNA pro ICAM-1 a VCAM-1 (p<0,05) v subkutánní tukové tkáni obézních žen.

Závěr: Naše výsledky ukazují, že subkutánní tuková tkáň není u obézních jedinců zásadním zdrojem cirkulujících koncentrací studovaných cytoadhezivních molekul a že jejich lokální exprese v subkutánní tukové tkáni je regulována rozdílně od jejich sérových koncentrací.

Podporováno grantem: IGA MZČR 8302-5 a MZO 00064165

ANTAGONISMUS TRANSKRIPČNÍCH FAL1:ORŮ GATA-L A PU.1 REGULUJE DIFERENCIAČNÍ KAPACITU LEUKEMICKÝCH BUNĚK.

Autoři: Pavel Burda, Nikola Čuřík, Juraj Kokavec, Arthur I. Skoultchi, Jiří Zavadil, Tomáš Stopka

Školitel: MUDr. Tomáš Stopka, PhD., Ústav patologické fyziologie 1. LF UK

Vývoj leukémie je doprovázen změnami exprese a mutacemi transkripčních faktorů řídících krvetvorbu. Modelovým příkladem leukemogeneze je dysregulace exprese myeloidního transkripčního faktoru PU.1 (Sfpi1, Spi-1), jež vede ke vzniku myší erytroleukemie (MEL). V buňkách MEL transkripční faktory PU.1 a GATA-1 vzájemně interagují a tím reprimují jeden druhému transkripční iniciaci cílových genů. Použitím kondičních transgenů GA T A-I nebo PU.1 jsme dosáhli reaktivace erytroidní, respektive myeloidní diferenciace v MEL buňkách doprovázené zástavou buněčného cyklu. Tento proces diferenciace leukemických buněk in víř'O jsme zkoumali globálními metodami celogenomové exprese na úrovni messenger RNA, mikroRNA a chromatinové lokalizace proteinů na DNA. Identifikovali jsme geny, jež jsou časným cílem vzájemného antagonismu GATA-1 a PU.1, a jež hrají roli v indukci diferenciace MEL buněk. Zjistili jsme specifické chromatinové změny na úrovni modifikace histonových proteinů v regulačních oblastech těchto genů. V této studii navrhujeme model indukce leukemických buněk v závislosti na GATA-1 a PU.1 se zapojením koaktivátorových transkripčních faktorů a chromatinových enzymů.

Granty: NR902I-4, 301/06/093, LC06044, 2B06077.

EXPRESI NUKLEOSTEMINU V DLAŽDICOVÝCH KARCINOMECH HLAVY A KRKU

Autoři: Zdeněk Čada, Jan Bouček, Barbora Dvořánková, Martin Chovanec, Jan Plzák, Roman Kodet, Jan Betka, Hans-Joachim Gabius, Karel Smetana Jr.

Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc., Jr., Anatomický ústav 1. LF UK

Úvod: Nádory hlavy a krku představují 5% všech nádorů, 90% z nich je tvořeno dlaždicovými karcinomy. I přes intenzivní rozvoj v diagnostice a terapii je 5-ti leté přežití pacientů s těmito nádory velmi malé. Jednou z možností jak



zlepšit včasnou diagnostiku je hledání vhodných markerů, které by umožnily lépe definovat charakter nádorů. Jedním z nich by mohl být protein nukleostemin, jehož exprese je charakteristická pro kmenové buňky různých tkání a z nich odvozených nádorů.

Cíle práce: Zmapování výskytu exprese nukleosteminu v buňkách normálních epitelů orofaryngu, laryngu a z nich odvozených nádorů v korelaci s dalšími znaky jako keratiny, β -kateninem, galectinem-1 a proliferacním markerem Ki-67.

Materiál a metodika: Vzorky normální sliznice orofaryngu a laryngu a karcinomy těchto tkání byly zmrazeny, nakrájeny a nukleostemin byl znázorňován spolu s endogenním lektinem, galectinem 1, keratiny, β -kateninem a proliferacním znakem Ki67 metodou mnohotného značení na úrovni 1 buňky. Výsledky byly studovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Eclipse 90i (Nikon) a analyzátoru obrazu LUCIA (5.1).

Výsledky: Ačkoliv nukleostemin byl přítomen i v jadřících diferencovaných buněk normálních epitelů, jeho výskyt byl výrazně vyšší v maligních epitelech. Tento náleznaznačuje, že studium tohoto nukleolárního proteinu by mohlo přinést nové poznatky o chování nádorových buněk transformovaných epitelů a snad být využito i při diagnostice.

Studie byla podpořena grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví No. NR 9049-3, Ministerstvem školství No. MSM 0021620806 a No. 1M0021620803 a EC Marie Curie Research Training Network grant No. MRTN-CT-2005-019561.

METODY INTERCEPTIVNÍ STOMATOLOGIE – KLINICKÉ PŘÍPADY

Autorka: MUDr. Irena Červená

Školitel: doc. MUDr. Jan Handzel, CSc., Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Interceptivní stomatologie je souhrn opatření a metod vedoucích ke zpomalení a zastavení infekčního onemocnění zubní kaz. Těmito metodami se ošetřují jednotlivé, již postižené, plošky jednotlivých zubů při současném zachování maximálního množství tvrdých zubních tkání. Díky tomu, že interceptivní stomatologie byla vyvinuta dětskými zubními lékaři právě pro ošetřování dětí a mládeže, jsou brány v potaz specifika dětského věku – kromě odlišnosti dočasných zubů také limitovaná schopnost spolupráce dětského pacienta, omezená komunikace i přirozený strach dítěte ze všeho neznámého a potenciálně bolestivého.

Pro ošetření pacienta metodami interceptivní stomatologie je nezbytná časná diagnostika infekčního onemocnění zubní kaz. Následují klinické výkony vedoucí ke kontrole plaku (mechanické i chemické), zajištění přívodu fluoridů z lokálních fluoridových preparátů i skloionomerních výplní, aplikovaných mnohdy jako „lak“. Materiály i nástroje jsou voleny s ohledem na různé povrchy zubu (hladká volná ploška, jamka, fisura, aproximální ploška) i možnou spolupráci pacienta. Nedílnou součástí interceptivní péče v ordinaci je poradenství – velká a naprosto nezbytná je část péče, aplikovaná rodiči a pacienty doma – dokonalá hygiena dutiny ústní, domácí aplikace fluoridů a dodržování správných stravovacích návyků.

Léčebný plán je možné rozdělit na 4 fáze – akutní ošetření, zvládnutí chorobného procesu, konzervační ošetření a stanovení rizika vzniku kazu s návrhem programu dalšího sledování pacienta.

Výše uvedené metody i léčebný plán demonstrujeme na dvou klinických případech (Anežky, 32 měsíců, poslaná na naše pracoviště k ošetření v celkové anestezii; a Mikuláše, přišel ve svých 34 měsících s periostitis acuta; oba byli primárně „neošetřitelní“). Obě děti byly ošetřeny bez použití CA či sedace, dnes mají sanovaný chrup a nejen že se zubaře nebojí, dokonce chodí do ordinace rády a s úsměvem. Díky spolupráci rodičů je riziko vzniku nového zubního kazu velmi malé.

Interceptivní stomatologie je dětmi díky bezbolestnosti velmi dobře akceptovatelná a přináší dlouhodobý výsledek. Jedná se o ošetření relativně náročné na čas i trpělivost personálu a nezbytná je také spolupráce rodičů. Je také nutno dořešit otázku úhrady interceptivní péče, neboť se jedná o velmi účinnou pomoc zejména při péči o děti a dorost.

MECHANIZMUS ÚČINKU KYSELINY ETHAKRYNOVÉ NA RŮST VIRU VAKCÍNIE

Autoři: Zdeněk Čížek, Martin Vokurka, Zora Mělková

Školitelka: MUDr. Zora Mělková, Ph.D., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Virus vakcínie (VV) byl v minulosti využíván k úspěšnému očkování proti černým neštovicím, způsobeným příbuznou variolou, které vedlo k eradikaci této choroby. V souvislosti s možnými bioteroristickými útoky některé země znovu začínají s očkováním vybraných skupin obyvatelstva (zdravotnictví, armáda). Očkování původní vakcínou, obsahující živý virus vakcínie, má však řadu nežádoucích reakcí, zatímco nové typy vakcín jsou teprve ve stadiu klinického zkoušení. Z těchto důvodů je třeba hledat nové látky obecně účinné proti poxvirové infekci.

V naší laboratoři jsme pozorovali inhibiční efekty kyseliny ethakrynové (EA) na růst VV v epitelálních buněčných liniích HeLa G a BSC-40, makrofázích a fibroblastech. V návaznosti na předchozí pokusy pokračujeme v analýze účinku EA na VV, který je studován také in vivo na myších.

Z našich výsledků vyplývá, že zvyšující se koncentrace EA inhibuje růst viru vakcínie, a to 5 μ M cca 10x a 10 μ M cca 100x. Efekt inhibitoru DNA syntézy, cytosin arabinosidu, na aktivitu luciferázy exprimované pod různými promotory VV naznačuje, že EA neinhibuje expresi časných virových proteinů, zatímco expresi pozdních proteinů ano. Snížená exprese pozdních virových proteinů byla potvrzena i western blot analýzou. V kontrastu s inhibicí exprese pozdních virových proteinů však EA neovlivňuje replikaci virové DNA, což bylo prokázáno pomocí kvantitativní real-time PCR analýzy. Inhibiční efekt EA na růst VV tak lze předpokládat na úrovni exprese pozdních virových proteinů.

Efekty EA byly dále zkoumány i na myších infikovaných virem vakcínie. Avšak z dosud provedených experimentů se zdá, že EA inhibuje celkovou imunitní odpověď organismu, pravděpodobně díky jejímu nedávno popsánému efektu na

transkripční faktor NF- κ -B. Nicméně EA či její derivát vhodně směřované do vybraných typů buněk by mohly být potenciale klinicky využitelné.

VLIV POLYMORFISMU - 493 G/T MIKROSOMÁLNÍHO TRIFLYCERIDOVÉHO TRANSFEROVÉHO PROTEINU NA PLASMATICKÉ LIPIDY A OXIDAČNÍ STRES U METABOLICKÉHO SYNDROMU

Autoři: Ladislava Duffková, Aleš Žák, Marie Jáchymová, Eva Tvrzická

Školitel: MUDr. Miroslav Zeman CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Metabolický syndrom (MS) je jedním z nejvýznamnějších zdravotních problémů průmyslově rozvinutých zemích světa a jeho léčba je hlavním cílem prevence kardiovaskulárních onemocnění. Na jeho rozvoji se podílí faktory genetické i faktory životního stylu (především zvýšený energetický příjem a snížená fyzická aktivita). Mikrosomální triglyceridový transferový protein (MTP) má nezastupitelnou úlohu při sestavování a sekreci lipoproteinů VLDL a chylomikronů. Gen pro MTP (4q24) je polymorfni; promotorová aktivita minoritní alely -493T je vyšší než aktivita běžné alely - 493G a je spojena se sekrecí objemných částic VLDL-1, jejichž metabolickou přeměnou pak mohou vznikat malé denzní LDL. Cílem studie bylo zjistit vliv polymorfismu -493 G/T MTP, MS a pohlaví na parametry metabolismu lipidů a glukosy.

Metodika: Vyšetřili jsme 270 probandů; ze 143 mužů mělo 50 MS a ze 127 žen byl MS přítomen u 36. Za účelem zjištění vlivu polymorfismu - 493G/T byli vyšetřeni rozděleni do skupin homozygotů GG a nositelů alely T (TT a GT). Jednotlivé skupiny vyšetřených osob se navzájem nelišily frekvencí alel ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 genu pro APOE. Antropometrické i biochemické parametry byly měřeny standardními vyšetřovacími metodami.

Výsledky: Nositelé alely T se od homozygotů GG lišili pouze ve skupině mužů s MS. Přítomnost alely -T zde zvyšovala koncentrace insulinu o 48 % (P < 0.01), index HOMA IR o 64 % (P < 0.05) a koncentrace NEFA o 49 % (P < 0.05); koncentrace plasmatického cholesterolu byly zvýšeny o 14 % (P < 0.05), triglyceridů o 95 % (P < 0.01), a hladiny konjugovaných dienu v LDL o 29 % (P < 0.01). Skupiny žen bez ohledu na přítomnost MS a alely -T se v uvedených parametrech nelišily.

Závěr: Naše výsledky ukazují na význam interakce genetických, metabolických a pohlavně podmíněných faktorů při zhoršení některých metabolických komponent syndromu insulinové rezistence.

Podporováno výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. MSM 0021620820.

FMRI KORELÁTY VNÍMÁNÍ ČASU

Autoři: Petr Dušek, R. Jech, J. Wackermann, J. Vymazal

Školitel: as. MUDr. Robert Jech, Ph.D., Neurologická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Čas se důležitým aspektem zpracování senzorické informace, kognitivních procesů i produkce motorické odpovědi. Naše znalosti o mechanismech jeho vnímání jsou však omezené. Cílem naší práce bylo nalézt "akumulátor" času, tzn. oblast mozkové kůry kam je ukládána informace o délce časového intervalu.

Materiál a metodika: Studie se zúčastnilo 9 zdravých osob, kteří během fMRI vyšetření řešili úlohu reprodukce časových intervalů (TRT). Úloha spočívala ve vizuální prezentaci časových intervalů o 8 různých délkách v intervalu 5 až 17 s (fáze prezentace). U kolem subjektu bylo zapamatovat si a následně reprodukovat délku časového intervalu pomocí stisku tlačítka (fáze reprodukce). Data byla zpracována dvěma způsoby. 1) pomocí event-related analýzy s vazbou na jednotlivé fáze úlohy a 2) pomocí parametrické analýzy (tzn. korelace vzrůstu/poklesu aktivace s délkou časového intervalu)

Výsledky: Event-related analýza prokázala zvýšenou aktivitu v řadě oblastí pravé hemisféry (mozeček, suplementární motorická oblast (SMA), dorsolaterální prefrontální kůra (DLPFC), cingulum a parietální kůra). Vlevo se aktivovaly primární a sekundární sensorické oblasti a insula. Bilaterální aktivaci jsme pozorovali v dolním frontálním a ve fusiformním gyru.

Pomocí parametrické analýzy jsme ve fázi prezentace zaznamenali inverzní korelaci aktivity s délkou časového intervalu v levém DLPFC a pravém předním cingulu. Ve fázi reprodukce se kromě deaktivace objevila i akumulace aktivity. K té došlo v levé DLPFC a primárním motorickém kortexu, v pravém kaudátu a v SMA bilaterálně. Deaktivace byla pozorována především v precuneu.

Závěr: Event-related analýza sice dobře popsala časový vývoj postupného zapojování mozkové kůry do řešení jednotlivých fází TRT úlohy, ale nedokázala odlišit oblasti, které souvisely s dalšími paralelními procesy, které exekutivní úlohu běžně doprovázejí. Oblasti identifikované parametrickou analýzou však mechanismy časové percepce reflektovaly lépe. Závislost úrovně aktivace na délce vnímaného intervalu je proto nepřímým důkazem existence „akumulátorů“ času v řadě oblastí mozkové kůry. Naše výsledky jsou přítom v souladu s předchozím výzkumem vnímání času, který poukázal na význam DLPFC a bazálních ganglií.

EPIDEMIOLOGICKÁ STUDIE INTOLERANCEKRAVSKÉHO MLÉKA A ZPŮSOBU VÝŽIVY DO 18. MĚSÍCE VĚKU (PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY)

Autor: MUDr. Jana Fabianová

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

Úvod: Pojem alergie na bílkovinu kravského mléka (dále ABKM) je chápán jako imunologicky podmíněná reakce na některou z bílkovin kravského mléka. Neexistuje imunologický test, který by jednoznačně určil diagnózu ABKM. Zlatým standardem je terapeutický pokus založený na eliminaci kravského mléka z výživy a následná reexpozice s opětovnou manifestací ABKM. Celosvětová incidence ABKM je podle prospektivních studií, s provedením reexpozičním testem, 1,9 - 2,5% u dětí mladších tří let. V České republice nebyla zatím provedena žádná prospektivní studie zabývající se danou problematikou. V roce 1999 byla realizována dotazníková retrospektivní studie s výslednou incidencí 0,26%.

Cíle: Hlavním cílem bylo zjistit incidenci ABKM potvrzenou reexpozicí formou prospektivní studie, popsat klinické projevy ABKM a zhodnotit způsob výživy sledovaných dětí.

Metodika: Soubor byl získán na neonatologickém odd. Gynekologicko-porodnické kliniky 1.LF UK a VFN. Do studie byly zařazené доноšené děti narozené od 02/2004 do 11/2004. Při propuštění z porodnice byl zajištěn telefonický kontakt na matky a nabídnuta možnost vyšetření dítěte při potížích. Studie byla realizována formou telefonického interview s matkou ve 3., 6., 12. a 18. měs. věku dítěte. Ke dni 30.8.2006 bylo ukončeno sledování 500 dětí (dívky 273, chlapci 227), z toho 200 dětí bylo vyřazeno pro ztrátu tel. kontaktu.

Výsledky a závěry: Bylo diagnostikováno 9 dětí s ABKM, tj. 3% sledovaného souboru, což odpovídá literárním údajům z evropských států. 33,3% dětí mělo bezprostřední reakci po podání mléčné formule (orální alergický syndrom, urtika, Quinckeho edém s dyspnoí), u 66,6% dětí se ABKM rozvíjela pozvolněji při kojení (kojenecké koliky, rýma a zahlenění, atopická dermatitida).

JEDNONUKLEOTIDOVÝ FUNKČNÍ POLYMORFISMUS - 1149G/T MIMOHYPOFYZÁRNÍHO PROMOTORU GENU PRO PROLAKTIN VE VZTAHU K SYSTÉMOVÉMU LUPUS ERYTHEMATODES

Autoři: Markéta Fojtíková, Marie Černá, Pavlína Čejková, Ctibor Dostál

Školitel: prof. MUDr. Ctibor Dostál, DrSc., Revmatologická klinika 1. LF UK

Úvod: Prolaktin je polypeptidový hormon sehrávající roli nejen v laktaci a reprodukci, nýbrž i v imunoregulaci organismu. Prolaktin působí jako cytokin a ovlivňuje zrání a diferenciaci imunitních buněk. Je exprimován v četných mimohypofyzárních lokalitách včetně T, B lymfocytů a monocytů. Mimohypofyzární exprese prolaktinu je řízena alternativním promotorem, ležícím cca 5,8 kb od hypofyzárního. V oblasti distálního promotoru byl popsán jednonukleotidový polymorfismus: -1149 G/T SNP. G alela tohoto polymorfismu je spojena s vyšší produkcí prolaktinu v lymfocytech. Vyšší frekvence G alely byla popsána u nemocných SLE v britské studii (Stevens, 2001), nepotvrzena však analýzou italskou (Mellai, 2003).

Metodika: Testované skupiny: 156 SLE nemocných, průměrný věk 43.4 let; 134 (85.9%) žen a 22 (14.1%) mužů a 123 zdravých jedinců, průměrný věk 38.7 let; 40 (32.5%) žen a 83 (67.5%) mužů. Úsek 137 párů bazí (bp) distálního promotoru genu pro prolaktin byl amplifikován pomocí PCR, poté bylo restriční endonukleázou Apo I provedeno restriční štěpení. Homozygotní genotyp TT se skládal ze 120 bp + 17 bp, homozygot GG 85 bp + 35 bp + 17 bp a GT heterozygot 120 bp + 85 bp + 35 bp + 17 bp úseků DNA. Výsledky byly zpracovány pomocí χ^2 test s Bonferroniho korekcí.

Výsledky: Nejistili jsme rozdíl v distribuci alel a genotypů -1149 G/T SNP mezi skupinou nemocných a kontrolní českou populací. Sledovali jsme klinické charakteristiky nemocných SLE (postižení CNS, plic, srdce, kloubů, kůže) ve vztahu k tomuto polymorfismu. Zde jsme zjistili asociaci mezi výskytem G alely a artritidou ($P_c = 0.0086$, OR = 2.56, CI 1.51-4.33). Dále jsme se zaměřili na věk pacientů při diagnóze SLE. Tuto veličinu jsme sledovali, neboť SLE se manifestuje zejména u žen ve fertilním věku. Zde jsme zjistili asociaci GG genotypu a SLE pacientů, u kterých nemoc propukla mezi 20-40 lety v porovnání s ostatními ($P_c = 0.023$; OR 2.94, CI 1.43-5.96). Nebyl nalezen žádný rozdíl u nositelů jednotlivých alel a vyjádřeným autoprotilátkovým syndromem.

Závěr: G alela a GG genotyp je spojen s určitými klinickými charakteristikami SLE – artritidou a věkem, kdy se SLE manifestuje.

PODOCALYXIN POZITIVNÍ ELEMENTY V MOČI JAKO KVANTITATIVNÍ MARKER U RŮZNÝCH GLOMERULOPATIÍ

Autor: MUDr. Peter Habara, KIA – Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN, Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN

Školitelka: MUDr. Helena Marečková, CSc., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF a VFN a Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN

Podocyty jsou ústředními buňkami v glomerulu podílející se na filtraci plazmy při tvorbě primární moči. Na svém povrchu exprimují sialoglykoprotein Podocalyxin. U různých typů glomerulopatií byla popsána přítomnost živých podocytů nebo jen jejich úlomků. Kvantum těchto elementů v moči koresponduje s mírou aktivity poškozujícího procesu glomerulu na rozdíl od proteinurie, která informuje hlavně o tíži poškození glomerulu. Záměrem naší práce je zavést metodu kvantifi-

kující počet podocalyxinových elementů v moči na průtokovém cytometru.

Při vývoji metody jsme narazili na řadu úskalí jako je vysoká autofluorescence moči, která interferuje s emitovaným světlem fluorochromu monoklonální protilátky. Dalším problémem byla kvantifikace. Klasickou průtokovou cytometrií lze získat pouze relativní čísla a procentuelní zastoupení jednotlivých částic v populacích. V moči je tento výsledek neakceptovatelný, protože celkový počet elementů se u pacientů, ale i zdravých jedinců liší, a proto jsme absolutní výsledky získali modifikací metody pro absolutní počítání krevních elementů. Dalším problémem je různá přítomnost proteinů v moči způsobující nescifickou vazbu monoklonálních protilátek.

Jako vzorek odebíráme střední proud prvé ranní moči, ke které přidáme náš prezervační roztok, který umožní hodnocení vzorku bez ztráty na kvalitě i po 2-3 dnech. Na identifikaci používáme anti-podocalyxinovou monoklonální protilátku, absolutní počet stanovujeme pomocí speciálních zkumavek s definovaným počtem kuliček. Dosud jsme vyšetřili 30 pacientů a 10 zdravých kontrol. U pacientů se hodnoty pohybují od desítek až po stovky elementů na ml moči, u zdravých kontrol 0-5/ml moči.

Předběžné výsledky ukazují, že metoda je schopna rozlišit jedince s aktivní nemocí od zdravé populace. Hlavním záměrem je ukázat, že metoda bude schopna sledovat dynamiku aktivity nemoci poškozující glomerulus a tím zlepšit možnosti monitorace úspěšnosti léčby pacientů se zejména glomerulonefritidami, morbus Fabry a predikce rizika rozvoje preeklampsie u těhotných žen.

EXPRESSE CYTOKINŮ V BUŇKÁCH PUPEČNÍKOVÉ KRVE DĚTÍ ZDRAVÝCH A ALERGICKÝCH MATEK

Autoři: Jiří Hrdý, Peter Zanvit, Olga Novotná, Jan Žizka, Rája Lodinová-Žádníková, Ingrid Kocourková, Ivan Šterzl, Ludmila Prokešová

Školitel: doc. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Výskyt alergických onemocnění neustále stoupá, proto na významu nabývá sledování prognostických znaků ukazujících na vznik alergických onemocnění s možností zavedení preventivních opatření. Jako vhodný prognostický znak ukazující na zvýšené riziko vzniku alergie se jeví exprese cytokinů v buňkách pupečnickové krve.

Metodika: Pomocí real-time PCR jsme porovnávali expresi IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, INF- γ , TNF- α a TGF- β v buňkách pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek. Metodou ELISA jsme měřili koncentraci výše zmíněných cytokinů v séru pupečnickové krve.

Výsledky: U dětí alergických matek byla exprese cytokinů IL-4, IL-8, INF- γ , IL-1 β , TGF- β signifikantně nižší a IL-10 vyšší ve srovnání s dětmi zdravých matek. Snížená exprese INF- γ u dětí alergických matek ukazuje na méně výrazný Th1 typ buněčné odpovědi a tím snazší rozvoj Th2 buněčné odpovědi podporující rozvoj alergie. Rovněž tak zvýšená exprese IL-10 v buňkách pupečnickové krve dětí alergických matek ukazuje na převahu Th2. Snížená exprese TGF- β u dětí alergických matek může přispívat k pomalejšímu vyzrání střevního epitelu novorozenců, a tím usnadňovat průchod antigenů (alergenů) a tedy i snazší navození alergie. TGF- β je klíčovým cytokinem izotypového přesmyku protilátek na IgA, který plní ochrannou funkci na slizničním povrchu střevních epitelů. Metodou ELISA jsme zjistili statisticky signifikantní rozdíly v séru pupečnickových krví dětí alergických a zdravých matek u IL-10 a EGF. Jelikož se EGF významnou měrou podílí na vyzrání střevního epitelu, tak jeho nižší koncentrace může negativně ovlivňovat vývoj střevní sliznice.

Závěr: Již na úrovni buněk pupečnickové krve (respektive séra pupečnickové krve) je zřejmý alergický fenotyp, který upozorňuje na zvýšenou možnost pozdějšího vzniku alergie.

Tato práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM002162080 a Grantové agentury ČR 310/03/H147.

REPETITIVNÍ TRANSKRANIÁLNÍ MAGNETICKÁ STIMULACE V LÉČBĚ PÍSAŘSKÉ KŘEČE

Autoři: Petra Havránková, Robert Jech, Nolan Walker, Josef Vymazal, Evžen Růžička

Školitel: as. MUDr. Robert Jech, Ph.D., Neurologická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Cílem studie bylo prokázat terapeutický vliv repetitivní transkraniální magnetické stimulace (rTMS) u pacientů s písářskou křečí. Jednalo se o placebo kontrolovanou, jednoduše zaslepenou studii.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 9 pacientek (průměrný věk 42,4 let \pm (SD) 9 let) s písářskou křečí, pravaček. Každá z pacientek absolvovala v průběhu studie dva 5 denní bloky s nízkofrekvenční (1 Hz) rTMS aplikovanou po dobu 30 minut. První blok spočíval v použití „reálné“ rTMS, druhý v aplikaci „placebo“ rTMS. Reálná rTMS byla cílena na primární somatosensorický kortex kontralaterálně k postižené končetině. Placebo rTMS byla provedena s náklonem cívky o 90 $^\circ$. Pacientky byly v průběhu studie opakovaně klinicky testovány. Před a po reálné rTMS bylo provedeno vyšetření funkční magnetické rezonancí (fMRI) během úlohy s aktivními a pasivními pohyby prstů pravé ruky.

Výsledky: U čtyř pacientek jsme po skončení bloku reálné rTMS pozorovali bezprostřední subjektivní či objektivní zlepšení písma a pocitů při psaní. Zlepšení trvalo 2 – 6 týdnů. U jedné z pacientek došlo k subjektivnímu zlepšení až za týden po skončení reálné rTMS. Po aplikaci placebo rTMS nebylo patrné zlepšení u žádné z pacientek. U pacientek s bezprostředním pozitivním klinickým efektem, jsme prokázali v obraze fMRI zvýšení aktivity v levostranném somatosensorickém kortexu v oblasti ruky. Toto zvýšení bylo přítomno během aktivních i pasivních pohybů postiženou končetinou. Aktivní pohyby byly navíc spojeny se zvýšenou aktivací v pravostranné hemisféře mozečku. U pacientek, u kterých nedošlo po rTMS ke zlepšení, nebyla v obraze fMRI zaznamenána žádná změna.



Závěr: V etiopatogenezi fokální dystonie se vedle poruchy motorického systému uplatňují i abnormality somatosensorického systému. To podporují i naše nálezy. rTMS vyvolala aktivaci somatosensorické kůry podmíněnou zřejmě funkční reorganizací nebo změnou kortikální excitability, což se následně projevilo zlepšením dystonie.

POVRCHOVÉ MAPOVÁNÍ CYSTATHIONIN β -SYNTHASY POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE NA PRINCIPU MALDI-TOF

Autoři: Aleš Hnízda, Janošik Miroslav, Kožich Viktor

Školitel: doc. MUDr. Viktor Kožich, CSc., Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN

Cystathionin β -synthasa (CBS) je tetramerní protein, který katalyzuje kondenzaci serinu s homocysteinem a jehož deficit je nejčastější příčinou homocystinurie. Regulace aktivity tohoto enzymu je klíčová pro metabolismus siřných aminokyselin; její mechanismus ale dosud není na atomové úrovni znám, neboť trojrozměrná struktura enzymu ještě nebyla zjištěna. Hlavní překážkou je hydrofobní charakter C-koncové části CBS, který znemožňuje vznik kvalitního krystalu, nutné podmínky pro podrobnou strukturní analýzu.

Cílem této práce je studium trojrozměrného uspořádání CBS metodou mapování povrchově dostupných postranních řetězců aminokyselin, jejíž pomocí lze popsat alespoň částečné strukturní aspekty studovaného proteinu. Tato metoda využívá specifická modifikační činidla aminokyselinových postranních řetězců; po modifikační reakci je protein štěpen vhodnými proteolytickými enzymy a výsledná směs peptidů analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF. Modifikace postranních řetězců je pak identifikována na základě definovaného posunu molekulové hmotnosti reagujících peptidů.

Pro optimalizaci metody povrchového mapování jsme použili CBS bez C-terminální části (tzv. aktivní jádro); zkrácená forma enzymu vykazuje katalytickou aktivitu a její krystalografická struktura je již popsána. Působení diethylpyrokarbonátu, běžně užívaného k modifikaci histidinových zbytků, vedlo k označení imidazolových zbytků His17, His22, His203 a His411, jež můžeme považovat za povrchově dostupné. Nativní elektroforézou a měřením enzymové aktivity aktivního jádra jsme ověřili, že modifikační zásah významně nenarušuje jeho strukturní a katalytické vlastnosti. Data získaná tímto přístupem jsou také v souladu s informacemi získanými rentgenostrukturní analýzou. Stejným způsobem budeme studovat povrchovou dostupnost postranních řetězců plnědelkové formy CBS a sledovat jejich změny vlivem interakce C-terminální domény s aktivním jádrem. Tento přístup by mohl vést k popisu některých strukturních rysů CBS a ve spojení s predikčním modelováním ke zjištění trojrozměrného uspořádání tohoto enzymu.

Tato práce byla podporována z grantu č. 303/03/4065 GA ČR.

ANALÝZA ČELISTNÍHO KLOUBU METODOU KONEČNÝCH PRVKŮ FEM ANALYSIS OF TEMPOROMANDIBULAR JOINT

Autor: MUDr. Ing. Radek Jirman, Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Školitel: prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc., Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Temporomandibulárními (TM) poruchami trpí v současné době 20 % populace a odhaduje se, že jenom 40 % postižených se úspěšně vyléčí a zbaví obtíží. Z anatomického a mechanického úhlu pohledu je temporomandibulární kloub (TMK) složitý bikondilární kloubní komplex, který je jedním z nejlépe zatěžovaných kloubů v lidském těle. Navíc jedinečnost spočívá především v tom, že dva stejné klouby se vyskytují na jedné kosti, dolní čelisti, a tak jakýkoliv pohyb nebo funkční odchylka jednoho z nich ovlivňuje i kloub druhý.

Tato práce je součástí většího projektu, jehož cílem je vytvořit konstrukční návrh nového typu totální náhrady TMK. Totální náhrada temporomandibulárního kloubu bude koncipována jako individuální náhrada. Tato problematika je celosvětově velice aktuální, bohužel stále není uspokojivě vyřešena.

V této práci byla provedena rekonstrukce celé lebky z CT a MRI snímků. Takto vytvořený geometrický model byl vysíťován šestistěnnými elementy a byla provedena výpočtová analýza pomocí metody konečných prvků (MKP) v programu ABAQUS. Výpočet byl uvažován jako nelineární kontaktní úloha, kde kontakt byl definován mezi TM diskem s kosti spánkovou a dolní čelistí. Použité materiálové modely pro jednotlivé části modelu (lebeční kosti, kloubní disk, vazy) byly uvažovány jako nelineární a nehomogenní. Velikost a způsob zatížení TMK byl zvolen tak, aby odpovídal situaci při skusu. Z provedené analýzy byly získány velikosti a rozložení napětí spolu s deformacemi působící na TMK.

MEZINÁRODNÍ KLASIFIKACE FUNKČNÍCH SCHOPNOSTÍ DISABILITY A ZDRAVÍ PACIENTŮ S OSTEOARTRÓZOU

Autoři: Martina Kasperová, Jiří Votava

Školitel: doc. MUDr. Jiří Votava, CSc., Klinika rehabilitačního lékařství 1. LF UK a VFN

Mezinárodní klasifikace funkčních schopností, disability a zdraví (dále MK) je alfanumerický kódovací systém, kterým je možno popsat zdravotní stav, aktivity a osobnost každého jedince. V anglickém jazyce tato klasifikace byla publikována v roce 2001 „International Classification of Functioning, Disability and Health“.

Do českého jazyka ji přeložil profesor Pfeiffer. WHO pracuje na vzniku širokoúhlé klasifikaci od roku 1972. Význam MK je především v tom, že dává možnost hodnotit numericky nejen zdravotní stav jedince, ale i míru handicapu, osobnost

a prostředí ve kterém se pacient pohybuje.

MK je členěna na dvě části. První část popisuje funkční schopnosti a zdravotní postižení a druhá spolupůsobící faktory. Části jsou rozděleny na komponenty, komponenty na domény. Základní jednotkou domény je kategorie. Stupeň problému v konkrétní kategorii se hodnotí pomocí kvalifikátorů. Hodnotit lze na třech úrovních podrobnosti v závislosti na využití výstupních dat. Pro časovou náročnost není možno používat všechny kódy u jednoho pacienta, proto byly vytvořeny výběrem kategorií vztahujících se ke konkrétnímu onemocnění. tzv. „Základní sestavy“ (CORE SETS).

Klinika rehabilitačního lékařství se účastní této mezinárodní studie od roku 2004 a používá ji u diagnóz RS, poranění mozku a artrózy.

Rádi bychom seznámili posluchače s výsledky naší práce, která zahrnuje soubor 100 pacientů s těžkou artrózou kolenního či kyčelního kloubu hodnocený pomocí „základních sestav“ na druhé úrovni podrobnosti MK. Práce rozpracovává i tzv. osobní faktory, které jsou zahrnuty v klasifikaci, ale nejsou podrobněji definovány.

Sběr dat probíhal u pacientů hospitalizovaných na ortopedicko-traumatologickém oddělení Oblastní nemocnice Příbram a.s. Jedná se většinou o pacienty indikované k aloplastice kolenního nebo kyčelního kloubu. Součástí dokumentace je informovaný souhlas pacienta, dotazník o zdravotním stavu a subjektivních obtížích.

SELF – HARMING BEHAVIOUR AND BODY AND PAIN PERCEPTION IN PATIENTS WITH EATING DISORDERS

Autoři: Vladimír Kmoch, Hana Papežová, Anna Yamamotová

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

INTRODUCTION: Clinical reports indicate that 5-9% of adolescents injure themselves deliberately (3). Studies of self-injurious behaviour point to higher rates in patients with personality disorders, mental retardation or eating disorders (ED) where deliberate self-harm (DSH) is present in 30-40%. We are examining the relationship between DSH, pain and body image perception (BIP) in ED patients. An elevated pain threshold is a consistent finding in eating disorders (2).

METHODS: Our preliminary data include comparison of 3 groups: ED (n=20), ED with DSH (n=10) and controls (n=20) were age, BMI, illness duration and diagnoses matched. Body image perception and dissatisfaction is measured by Anamorphic Micro software, Body attitude test (BAT) and Somatoform dissociation questionnaire (SDQ-20). We diagnosed the comorbidity with Mini International Neuropsychiatric Interview. Pain threshold latencies for thermal stimuli were measured using the Analgesia meter (IITC Life science USA-Model 33) under mental arithmetic stress and rest conditions.

RESULTS: 10 patients from the total of 93 had displayed DSH in the past. The ED-DSH group didn't show any differences in pain threshold from the controls (contrary to ED), but we found that the stress analgesia of the ED-DSH group was significantly lower than controls ($p=0,01$) and ED ($p=0,03$). Dissatisfaction characteristics from Anamorphic Micro correlated with BAT ($r=-0,82$; $p=0,007$) but not significantly with SDQ-20.

CONCLUSION: We found lower stress analgesia in the ED-DSH group and we suppose that further pain and body perception studies are promising for understanding neuropathophysiology in ED.

VYUŽITÍ RNA INTERFERENCE PŘI STUDIU ÚLOHY GLYKOGENFOSFORYLÁZY BĚHEM ENCYSTACE VOLNĚ ŽIJÍCÍCH AMÉB RODU ACANTHAMOEBA

Autoři: Jarmila Klieščíková, Jacob Lorenzo-Morales, Eva Nohýnková

Školitelka: RNDr. Eva Nohýnková, Ph.D., Oddělení tropické medicíny – III. kliniky infekčních a tropických nemocí 1. LF UK a FN Na Bulovce

Patogenní volně žijící améby rodu *Acanthamoeba* mohou být původci závažných infekcí člověka. Ložiskový zánět mozku je téměř vždy smrtelný, zánět rohovky, který ohrožuje zrak, lze léčit, ale léčba je zdlouhavá a může selhat. Jedním z důvodů je absence účinných a specifických léků, které by dokázaly působit i na klidová rezistentní stádia – cysty. Mechanismus diferenciací akantaméb ve zralé cysty s dvouvrstevnou stěnou zatím nebyl detailně prostudován, i když je zřejmé, že důležitou součástí tvorby cystové stěny je syntéza celulózy, která je jednou z hlavních stavebních složek obou vrstev stěny cysty akantaméb. Celulóza je polysacharid složený z glukózových podjednotek spojených $\beta(1,4)$ -vazbou. Vzhledem k tomu, že k encystaci dochází také při nedostatku živin, trofozoiti musí obsahovat vhodný zdroj UDP-glukózy. Glykogenfosforyláza je hlavním enzymem štěpícím glykogen za vzniku glukózo-1-fosfátu. V naší práci jsme sledovali průběh encystace a syntézy celulózy při současné inhibici exprese mRNA tohoto enzymu prostřednictvím RNA interference. Glykogenfosforyláza je u akantaméb exprimovaná od 8 do 24 hodiny po indukci encystace. V důsledku inhibice exprese tohoto enzymu dochází ke tvorbě nezralých jednostěnných „precyst“ se sníženou odolností k nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí. Protože zvýšení obsahu glukózy v médiu v přítomnosti interferující RNA (siRNA) vede k tvorbě dvouvrstevné cystové stěny je zřejmé, že pravděpodobným zdrojem glukózy pro syntézu celulózy ve vnitřní vrstvě cysty je glykogen.

**VLIV SEPSĚ NA AKTIVITY GLUTATHIONPEROXIDASY A GLUTATHIONREDUKTASY****Autoři:** Jana Kodydková, Lucie Vávrová, František Novák, František Novák, Jr., Aleš Žák**Školitel:** RNDr. Eva Tvrzická, CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Oxidační stres a antioxidační rovnováha jsou v současné době velmi diskutovanou otázkou v oblasti akutní medicíny a intenzivní péče. K oxidačnímu stresu dochází při porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (RONS). Předpokládá se vliv oxidačního stresu v patogenese infekčních (sepsa a septický šok), endokrinních (diabetes mellitus), gastrointestinálních (akutní pankreatitida), kardiovaskulárních (aterosklerosa) a neurodegenerativních (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba) chorob. Infekční onemocnění a jejich celkové příznaky v podobě sepsy patří i přes pokroky v medicíně stále k závažným příčinám onemocnění a úmrtí pacientů. Antioxidační enzymy jako je glutathionperoxidasa (GP_x) a glutathionreduktasa (GR) se podílejí na udržení antioxidační rovnováhy. Studie byla zaměřena na sledování pacientů se sepsí a srovnání se dvěma kontrolními skupinami – kriticky nemocnými osobami bez přítomnosti sepsy a zdravými kontrolami.

Metodika: Kontrolní skupiny byly párovány podle pohlaví a věku (zdravé osoby) a podle pohlaví, věku a skóre APACHE II (kriticky nemocní bez sepsy). Aktivity enzymů byly stanoveny v erythrocytech kinetickými spektrofotometrickými metodami.

Výsledky: Byly zjištěny snížené aktivity glutathionperoxidasy v erythrocytech u pacientů v sepsi v porovnání se zdravými kontrolami (40,45±13,10 U/g Hb vs. 57,68±7,02 U/g Hb; n=13; p<0,05). S uzdravováním pacienta aktivita GPX1 rostla. Mezi glutathionperoxidasou a selenem byla prokázána pozitivní korelace (r=0.615, p<0,00001). Nízká koncentrace selenu byla pravděpodobně jednou z příčin snížené aktivity GPX1. Aktivita GR byla u septických pacientů vyšší než u ambulantních kontrol (8,86±2,73 U/g Hb vs. 6,61±1,12 U/g Hb, p<0,05), v průběhu uzdravování pacienta se snížila na hodnoty srovnatelné se zdravými osobami.

Závěr: Na základě získaných výsledků by mohla být do budoucna použita stanovení aktivit GPX a GR jako markerů probíhající sepsy u kriticky nemocných pacientů.

Podporováno grantem Ministerstva zdravotnictví ČR č. NR/8943-4 IGA a výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. MSM 0021620820.

EFFECT OF HEME AND S - ADENOSYL - L- METHIONINE ON FOLDING AND ACTIVITY OF CYSTATHIONINE BETA – SYNTHASE MUTANTS**Autoři:** Jana Kopecká, Hnízda Aleš and Kožich Viktor**Školitel:** doc. MUDr. Viktor Kožich, CSc., Institute of Inherited Metabolic Diseases, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine

Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency is the most common defect in sulphur amino acids metabolism, which is caused by pathogenic mutations in the CBS gene. Misfolding and aggregation of mutant polypeptides have been proposed to play role in pathogenesis of CBS deficiency. Pharmacological chaperones – a class of chemical compounds, which at low concentrations stabilize mutants and prevent aggregation – are being recently explored as a treatment modality in different genetic disorders. Our study was aimed at determining the effect of possible pharmacological chaperones on quaternary structure and activity of a panel of 27 pathogenic mutations, representing two thirds of patient-derived alleles.

Two natural ligands of CBS – delta-aminolevulinic acid (d-ALA), a precursor of heme, and allosteric activator S-adenosyl-L-methionine (SAM) – were used in an E.coli expression system and their effect on mutants was examined by native western blotting and radiometric assay. Presence of 0.5 mM d-ALA during expression facilitated formation of correctly folded tetramers for 5 mutants (increase by 10-40 % compared to medium without d-ALA); in P78R, V180A and R266K mutations the improved folding was accompanied by a 2-3 fold increase in catalytic activity. In contrast, we did not observe any effect of 0,5mM or 1 mM SAM on quaternary structure and/or activity of mutants. These data suggest that co-translational elevation of heme concentrations may promote correct folding and assembly of a subgroup of CBS mutants, which in turn rescues their enzymatic activity. In summary, this ongoing study expands the understanding of molecular mechanisms in CBS deficiency and suggests that for patients with CBS deficiency novel therapeutic strategies may emerge in future.

This work was supported by the Wellcome Trust Senior Fellowship and by grant 303/03/H065 from GA ČR.

HYPERKINETICKÝ SYNDROM/PORUCHA POZORNOSTI – STUDIUM GENETICKÝCH ASPEKTŮ**Autoři:** Marta Kopečková, Křepelová Anna, Goetz Petr, Petrášek Jan**Školitel:** doc. MUDr. Ivo Paclt, CSc., Psychiatrická klinika, 1. LF UK a VFN

Hyperkinetický syndrom / porucha pozornosti (ADHD) představuje závažný sociálněmedicinský problém, protože postihuje značnou část dětské populace (3-10%). Klinicky charakterizován nepozorností, impulzivitou a hyperaktivitou. ADHD je onemocnění multifaktoriální a geneticky heterogenní a v současné době je známo více než 30 genů podílejících se na

vzniku a vývoji onemocnění. Jednotlivé alely těchto genů mohou být v populaci relativně časté, protože nepředstavují klasické mutace, ale polymorfismy, které jsou příčinou arteficiální aktivity produktu.

Studium jednotlivých transmitterových systémů, které jsou do patogeneze ADHD zapojeny, a poznání vlivu genetického podkladu na jejich funkční změny může v budoucnosti pomoci při volbě vhodného psychofarmaka vzhledem k tomu, že v léčbě hyperkinetické poruchy se uplatňují látky s různým mechanismem účinku. Ke studiu byly proto vybrány geny systému dopaminergního (DRD2, DRD3 a DAT1), noradrenergního (DBI) a serotoninergního (5-H1T) u nichž byla provedena molekulárně-genetická analýza 11 polymorfismů se základní strategií založenou na asociačním studiu „případ-kontrola“. Přítomnost rizikových alel byla porovnána v souboru 100 dětí s ADHD a v kontrolní skupině 100 jedinců, u nichž byly příznaky ADHD vyloučeny testem Connersové. Výsledky našeho výzkumu svědčí pro asociaci genů DRD2, 5-HTT, DA T1 a DBH s ADHD. Konkrétně po korekci výsledků na mnohočetné testování, korekci na pohlaví a po provedení power-analýzy platí: 1) riziko ADHD je signifikantně zvýšeno u nosičů polymorfní alely v genech DRD2 (7,5-krát), 5-HTT (2,7-krát) a DAT1 (1,6-krát); 2) riziko ADHD je signifikantně zvýšeno u homozygotů pro polymorfní alely v genech DRD2 (54-krát), 5-HTT (6,7-krát) a DAT1 (6,6krát); 3) riziko ADHD je signifikantně zvýšeno u nosičů polymorfní alely DBH +444A, kteří jsou současně nosiči polymorfní alely DBH +I603T(14,9-krát).

Genetické přístupy ve výzkumu ADHD mají zásadní význam nejen teoretický, ale také praktický. Otevírají perspektivu volby farmaka podle genetické etiologie. Farmakologický přístup je v současnosti neúčinnější formou léčby a jeho včasná aplikace brání rozvoji sekundárních poruch.

MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE MENKESOVY CHOROBY

Autor: Mgr. Lubomír Králík

Školitel: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Úvod: Menkesova choroba je vzácně se vyskytující recesivní genetické onemocnění vázané na chromosom X s těžkou poruchou metabolismu mědi. Postižení muži trpí celkovým nedostatkem mědi v důsledku chybné distribuce mědi v těle projevující se snížením pevnosti pojivových tkání a vážnými neurodegenerativními poruchami. Choroba je způsobena mutací Menkesova genu (ATP7A), který zaujímá asi 140 kb genomové DNA a obsahuje 23 exonů, které kódují 1500 aminokyselin dlouhou transmembránovou ATPasu typu P účastnící se přenosu mědi v buňce.

Metodika: Genomová DNA čtyř nepříbuzných nemocných s Menkesovou chorobou z Česka a Slovenska byla vyšetřena pro přítomnost mutací v genu ATP7A využitím přímého sekvenování všech 23 exonů, které byly namnoženy pomocí PCR. Zjištěné mutace byly následně rovněž ověřeny restriční analýzou.

Výsledky: U vyšetřovaných nemocných byly v genu ATP7A nalezeny: Q724X, G727R, E1249X a Q1288X. Mutace Q724X a E1249X dosud nebyly publikovány.

Závěr: V genu ATP7A jsme našli nové mutace - Q724X a E1249X. Tyto mutace vedou k předčasnému ukončení Menkesova proteinu. Nález vede k hlubšímu pochopení molekulární podstaty Menkesovy choroby a je důležitý rovněž pro prenatální diagnostiku tohoto letálního onemocnění v postižených rodinách.

Podpořeno granty GAUK 109/06, GAČR/303/03/H065, MŠMT 0021620806.

LZE ŘÍDIT LÉČBU SRDEČNÍHO SELHÁNÍ PODLE NATRIURETICKÉHO PEPTIDU TYPU B? (STUDIE OPTIMA - DESIGN, PRVNÍ VÝSLEDKY)

Autor: MUDr. Jan Krupička

Školitel: prof. MUDr. Jaromír Hradec, CSc., III. interní klinika - klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Úvod: Kardiální dysfunkce vede k neurohormonální odpovědi, jejímž výsledkem jsou i zvýšené plazmatické hladiny natriuretických peptidů (NP). Při srdečním selhání (SS) mají NP význam diagnostický a prognostický. Objevily se také zprávy, že pomocí NP lze řídit léčbu nemocných se SS.

Cíl práce: Posoudit, zda léčba SS se snahou docílit normální hladinu natriuretického peptidu typu B (BNP) povede ke snížení výskytu kardiovaskulárních příhod.

Uspořádání studie: Do studie bude zařazeno 100 pacientů hospitalizovaných pro akutní SS (primomaniestace či zhoršení chronického SS). Tito nemocní budou randomizováni na léčbu k co nejnižší hladině BNP (skupina BNP) a na léčbu dle klinického stavu (klinická skupina). Nemocní budou sledováni v 3 měsíčních intervalech po dobu 2 let. Sledovaným klinickým ukazatelem je součet všech úmrtí, hospitalizací pro SS a zhoršení SS bez nutnosti hospitalizace.

Výsledky: K datu odeslání abstraktu bylo zařazeno 32 pacientů průměrného věku 73 let, s průměrnou hodnotou vstupního BNP 669 pg/ml. Během ročního sledování byl nižší výskyt epizod dekompenzace SS ve skupině BNP oproti skupině klinické (12 vs 15). Pouze u 2/3 pacientů bylo možné při intenzifikované farmakologické léčbě dosáhnout normální hladinu BNP.

Závěr: Vzhledem k malému počtu nemocných nelze zatím předběžná data statisticky hodnotit. První výsledky však naznačují, že stanovování hladin BNP u pacientů s chronickým SS může pomoci časně odhalit hrozící kardiální dekompenzaci a umožňuje upravit léčbu jednotlivým pacientům na míru se snahou dosáhnout cílovou hodnotu BNP. Ne u každého pacienta však lze dosáhnout normalizace této hodnoty.

**NÁSLEDKY OTRAV HEPATOTOXICKÝMI A NEFROTOXICKÝMI NOXAMI****Autorka:** Martina Křenová**Školitelka:** prof. MUDr. Daniela Pelclová, CSc., Toxikologické informační středisko, Klinika nemocí z povolání 1. LF UK a VFN

Úvod: Předmětem práce je zhodnocení průběhu akutní intoxikace a dlouhodobých následků po požití vybraných látek s hepatotoxickými a nefrotoxickými účinky.

Metodika: Studie byla prováděna retrospektivně v letech 2000-2004 na základě informací získaných z dokumentace intoxikovaných pacientů muchomůrkou zelenou (Am. ph.) nebo etylénglykolem (EG) léčených ve spolupráci s Toxikologickým informačním střediskem v Praze nebo toxikologickými laboratořemi na území České republiky.

Výsledky: Hodnotili jsme 37 propouštěcích zpráv intoxikovaných osob Am. ph. Ze 35 pacientů, kteří přežili akutní fázi intoxikace, bylo hepatotoxické poškození potvrzeno u 17 osob a nefrotoxické poškození u 9 osob. Pět osob nebylo dále sledováno. Funkce jater se upravila u 8 osob do 1 měsíce, u 3 osob do 6 měsíců a u 1 muže do 18 měsíců po otravě. Funkce ledvin se upravila u 5 osob rychle během hospitalizace po rehydrataci, u 2 osob do 9 měsíců až 2 let po otravě. Pacientka s agenezí jedné ledviny, s hypertenzí a s diabetem zemřela za 20 měsíců po otravě (přetrvávalo renální poškození). U jediné ženy trvá poškození ledvin s nutností hemodialýzy ještě po 4 letech od intoxikace. U této pacientky však nebyla mikroskopická analýza spor provedena, nelze proto vyloučit požití jiné nefrotoxické houby. Získali jsme 206 propouštěcích zpráv intoxikovaných osob EG. Z počtu 182 pacientů, kteří přežili akutní fázi intoxikace, se nefrotoxické poškození objevilo u 50 osob. Deset osob nebylo dále sledováno. U 19 osob se funkce ledvin upravila do 1 měsíce, u 13 osob do 6 měsíců, u 3 osob v rozmezí 8 měsíců až 2 let po otravě. U 5 osob při poslední kontrole v době za 19-50 měsíců zatím nedošlo k plné úpravě, nebyla již u nich nutná hemodialýza. Jejich koncentrace kreatininu podstatně poklesly, poslední hodnoty byly v rozpětí 119-200 mmol/l. Hlavními příčinami delší rekonvalescence bylo nejzávažnější renální poškození v akutní fázi otravy u pacientů ve vysokém věku s hypertenzí.

Závěr: Z našeho sledování vyplývá, že toxické orgánové poškození po otravě Am. ph a EG je většinou plně reverzibilní. Přechod do chronicity je velmi vzácný. Významnou roli může hrát zejména předchozí onemocnění těchto orgánů.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem č. MSM 0021620807 MŠMT České republiky

AKTIVACE KASPÁZ PŘI INFEKCI BUŇKY VIREM VAKCÍNIE**Autorky:** Jana Lišková, Zora Mělková**Školitelka:** MUDr. Zora Mělková Ph.D., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Ve většině buněčných typů způsobuje infekce virem vakcínie lýzu buňky, která se považuje za ekvivalent nekrózy. V naší laboratoři jsme však pozorovali zvýšenou aktivaci kaspáz ve vakcínii infikovaných buňkách (linie BSC-40 a HeLa G) v porovnání s neinfikovanými buňkami.

Aktivaci kaspáz jsme měřili dvěma metodami využívajícími průtokovou cytometrii, a to pomocí CaspACE (fluorescenční pan-kaspázový inhibitor) a Rhodamine 110-bis-aspartate (fluorescenční nespecifický substrát kaspáz). Dále jsme metodou western blottingu pozorovali štěpení substrátu kaspáz cytokeratinu 18 a vznik jeho specifického neoepitopu (M30) po štěpení kaspázami. Jiný typický cíl kaspáz PARP však v buňkách infikovaných vakcínii štěpen není. Abychom se ujistili o specifitě detekce aktivity kaspáz, provedli jsme kompetici fluorescenčního kaspázového inhibitoru CaspACE a jeho nefluorescenčního ekvivalentu. Nefluorescenční inhibitor kaspáz výrazně snížil fluorescenci infikovaných buněk, zatímco kontrolní inhibitory specifické pro calpain tuto fluorescenci nesnižovaly. Podobné kompetiční experimenty jsme provedli i s inhibitory specifickými pro jednotlivé kaspázy (kaspázu 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9,10, 13). Ukázalo se, že v buňkách infikovaných virem vakcínie jsou výrazně aktivovány kaspázy 2 a 4, mírně také kaspáza 3. V současné době se zabýváme ověřením aktivity těchto kaspáz western blottingem a pomocí specifických fluorescenčních substrátů.

Aktivace exekutorové kaspázy 3 je zřejmě omezená díky četným antiapoptotickým faktorům kódovaným virem vakcínie. Úloha kaspáz 2 a 4 v apoptóze není zcela jasná, ale zřejmě se obě podílejí i na zánětlivé signalizaci, což by mohlo být významné pro typ imunitní odpovědi organismu při infekci virem vakcínie.

IDENTIFIKACE NOVÝCH MUTACÍ V GENU ZEB1 U ČESKÝCH A BRITSKÝCH PACIENTŮ SE ZADNÍ POLYMORFNÍ DYSTROFIÍ ROHOVKY**Autoři:** Petra Lišková, Rhian Gwilliam, Neil D. Ebenezer, Marike Pretorius, Alison J. Hardcastle, Martin Filipec, Shomi S. Bhattacharya**Školitel:** prof. MUDr. Martin Filipec, DrSc., Laboratoř biologie a patologie oka 1. LF UK a VFN

Úvod: Cílem práce byla identifikace mutací v šesti českých vzájemně nepříbuzných a čtyřech britských rovněž vzájemně nepříbuzných rodinách se zadní polymorfní dystrofií rohovky (ZPD); relativně vzácného očního onemocnění.

Metodika: Pomocí přímého sekvenování byl proveden screening kódujících exonů a hranic intronů s exony všech třech genů (VSX1, COL8A2 a ZEB1/TCF8), které byly zatím popsány jako ZPD podmiňující. V českých rodinách bylo dále provedeno genotypování markerů v lokusu 20p11.2 za účelem testování možného zakladatelského efektu.

Výsledky: Identifikovány byly čtyři nové patogenní mutace ve čtyřech rodinách; dvě delece, jedna terminační mutace a jedna duplikace v exonu 7 ZEB1 genu nacházejícím se v lokusu 10p11.2. Genotypování českých rodin neprokázalo stejný haplotyp jako u jiných dříve popsanych dvou rodin mapovaných do oblasti 20p11.2.

Závěr: Naše práce potvrzuje roli ZEB1 genu v patogenezi ZPD a poukazuje na genetickou heterogenitu tohoto onemocnění. Absence nálezu příčinných mutací v šesti rodinách naznačuje, že ZPD je pravděpodobně způsobena dalšími dosud neidentifikovaným(i) genem nebo geny.

SROVNÁNÍ POČÍTAČOVÉHO ALGORITMU S VARIABILNÍM INTERVALEM PRO MĚŘENÍ GLYKÉMIE A STANDARDNÍHO PROTOKOLU PRO INTENZIVNÍ INZULÍNOVOU TERAPII U KRITICKY NEMOCNÝCH PACIENTŮ

Autoři: Miloš Mráz¹, J. Křemen¹, J. Bláha², M. Matias², P. Kopecký², J. Rulišek², E. Kotlíková¹, T. Roubíček¹, L. Bošanská¹, Š. Svačina¹, R. Hovorka³, M. Haluzík¹, ¹III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN, ² Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. LF UK a VFN, ³ Clinical School of Medicine, University of Cambridge, Velká Británie

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

Úvod: Inzulínovou rezistencí navozená hyperglykémie je častým jevem u kriticky nemocných pacientů a vyskytuje se jak u diabetiků, tak u pacientů bez předchozí anamnézy diabetu. Bylo prokázáno, že udržení normoglykémie pomocí intenzivní inzulínové terapie významně snižuje morbiditu i mortalitu u těchto pacientů. Cílem naší studie bylo srovnání počítačového algoritmu s variabilním intervalem pro měření glykémie (eMPC – enhanced Model Predictive Control) a standardního protokolu pro intenzivní inzulínovou terapii u kriticky nemocných pacientů používaného na pooperační JIP kliniky kardiologické chirurgie 1. LF UK a VFN.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 60 pacientů, kteří podstoupili elektivní kardiologický výkon (aortokoronární bypass, chlopní náhrada), 30 pacientů bylo randomizováno pro léčbu pomocí eMPC algoritmu, 30 pro léčbu pomocí standardního protokolu. Cílová glykémie byla 4,4–6,1 mmol/l, délka studie byla 24 hodin od začátku operace. Glykémie byla měřena a rychlost inzulínové infuze byla upravována v 1–4 hodinových intervalech v závislosti na požadavku algoritmu, resp. protokolu.

Výsledky: Průměrná hodnota glykémie dosahovala $6,15 \pm 1,11$ mmol/l ve skupině léčené pomocí eMPC algoritmu, oproti $7,21 \pm 1,08$ mmol/l ve skupině léčené pomocí standardního protokolu, v cílovém rozmezí se nacházelo $60,4 \pm 22,8\%$ vs. $27,5 \pm 16,2\%$ naměřených hodnot. Doba v hyperglykémii byla $7,4 \pm 4,7$ vs. $16,7 \pm 4,1$ hodin, v žádné skupině nebyla zaznamenána epizoda závažné hypoglykémie ($<2,9$ mmol/l). Průměrná rychlost inzulínové infuze byla $4,67 \pm 3,34$ vs. $2,57 \pm 1,66$ IU/h, průměrný interval mezi jednotlivými měřeními byl $1,46 \pm 0,31$ vs. $2,10 \pm 0,22$ hodin.

Závěr: Výsledky naší studie ukazují, že algoritmus s variabilním intervalem pro měření glykémie je k udržení cílových hodnot glykémie u kriticky nemocných pacientů efektivnější než standardní protokol.

OBSAH FLUORIDU V PRODUKTECH INTAKTNÍ MLÉČNÉ VÝŽIVY

Autoři: Edgar Oganessian, Milada Koštířová, Zdeněk Broukal
Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc, Výzkumný ústav stomatologický, 1. LF UK a VFN

Úvod: Odhad příjmového pozadí fluoridu z výživy u kojenců a batolat je rozhodující pro indikaci fluoridové suplementace. Obsah fluoridu v mateřském mléce je obvykle velmi nízký, stejně jako v balených kojeneckých vodách doporučených pro obnovování instatní mléčné výživy (IMV) (Oganessian E.: Ces. Stomatol., 2007, v tisku). Cílem studie bylo stanovit obsah fluoridu v produktech IMV od výrobců Hero, Nestlé a Nitricia dostupných v České republice. Analýzy byly provedeny v 8 produktech IMV pro děti od jednoho do tří měsíců, v 8 produktech pro děti 4–10 měsíců a v 6 produktech pro děti starší 10 měsíců.

Metodika: Substance IMV byly rozpuštěny jednak v deionizované vodě a jednak v balených kojeneckých vodách obsahujících 0,15 a 0,56 ppm fluoridu. Obsah fluoridu byl stanoven po extrakci mikrodiffuzí za pomoci hexametyldisiloxanu (van Staden, van Rensburg: Analyst, 1991;116:807-10) inotově selektivní elektrodou ELIT 8221 (Nico, USA) a ionometrem InoLab pH/ION 735P (WTW, Germany). V přípravné fázi studie jsme ověřili, že použitá extrakční metoda má ztráty menší než tři procenta fluoridu při použití roztoků o známé koncentraci.

Výsledky: Obsah fluoridu v měřených vzorcích produktů IMV: 0,01 až 0,66 ppm při rozpuštění v deionizované vodě, 0,02 až 1,06 ppm a 0,56 až 1,25 ppm při rozpuštění v kojeneckých vodách s obsahem 0,15 a 0,56 ppm fluoridu. Produkt IMF, Sunar Complex Premium (Hero), má výrobcem upravený obsah fluoridu na 0,50 mg F/100 g prášku. Jeho obsah fluoridu po rozpuštění v deionizované vodě a v kojeneckých vodách s obsahem 0,15 a 0,56 ppm F byl v rozmezí od 0,67 do 1,08, od 0,85 do 1,24 a od 1,05 do 1,45 ppm fluoridu.

Závěr: Standardní produkty IMV tedy nepřispívají významnou měrou k příjmovému pozadí fluoridu u kojenců a batolat. Sunar Complex Premium by však měl být obnovován kojeneckými vodami nebo balenými vodami vhodnými pro kojence s nízkým obsahem fluoridu. U dětí živěných tímto produktem IMV se podávání alimentární fluoridové suplementace formou tablet nedoporučuje.

Grant č. NR/8331-3, IGA, MZČR.

ZVÝŠENÁ PRODUKCE ANGIOTENSINOGENU V EPIKARDIÁLNÍ TUKOVÉ TKÁNI PŘI KARDIOCHIRURGICKÉM ZÁKROKU: MOŽNÝ VLIV NA POOPERAČNÍ INZULINOVOU REZISTENCI

Autoři: Tomáš Roubíček, Jaromír Křemen, Jan Bláha, Markéta Dolínková, Lenka Bošanská, Štěpán Svačina, Martin Haluzík
Školitel: doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc., III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu
 1. LF UK a VFN

Úvod: Zvýšení glykémie nad normální mez je u kriticky nemocných pacientů častým jevem a to nejen u nemocných s anamnézou diabetu, ale i u pacientů s dosud normálním metabolismem glukózy. Bylo prokázáno, že na vzniku inzulinové rezistence u těchto pacientů se podílí i tuková tkáň produkcí mnoha prozánětlivých cytokinů. V poslední době je podrobněji zkoumán lokální renin-angiotensinový systém tukové tkáně s ohledem na možný podíl při vzniku inzulinové rezistence. Dosud však chyběly údaje o lokální změně renin-angiotensinového systému tukové tkáně u kriticky nemocných pacientů. Cílem naší studie bylo studovat změny lokální produkce renin-angiotensinového systému tukové tkáně při kardiochirurgickém zákroku.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 10 pacientů, kteří podstoupili plánovanou kardiochirurgickou operaci. Na začátku a na konci operace byly odebrány vzorky subkutánní a epikardiální tukové tkáně. Ve vzorcích byla stanovena exprese mRNA pro angiotensinogen, angiotensin-konvertující enzym, a receptor pro angiotensin II. typ 1.

Výsledky: Expres mRNA pro angiotensinogen významně vzrostla v epikardiální tukové tkáni na konci operace. Expres mRNA pro angiotensin-konvertující enzym a receptor pro angiotensin II. typ 1. zůstala v subkutánní i epikardiální tukové tkáni nezměněna.

Závěr: Zvýšená produkce angiotensinogenu epikardiální tukovou tkání může ovlivňovat vznik pooperační inzulinové rezistence.

MIKROSATELITOVÁ ANALÝZA NA CHROMOZOMU 3 VE TKÁNI KONVENČNÍHO (SVĚTLBUNĚČNÉHO) RENÁLNÍHO KARCINOMU

Autoři: Monika Szakácsová, Babjuk M., Mareš J., Soukup V., Peší M., Dušková J., Dvořáček J.
Školitel: doc. MUDr. Marko Babjuk, CSc., Urologická klinika 1. LF a VFN

Cíl: Zhodnotit prognostický význam mikrosatelitové analýzy na 3. chromozomu u pacientů s konvenčním nádorem ledvin.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 63 pacientů (věk 33 - 85 let, průměrný věk 69,1 roku) s histologicky prokázaným lokalizovaným konvenčním (světlobuněčným) renálním karcinomem, u kterých byla provedena nefrektomie nebo resekce ledviny. Velikost nádorů se pohybovala od 2 do 12cm, diferenciacie nádorů dle Fuhrmanové byla hodnocena jako G1 u 36, jako G2 u 25 pacientů. Ve tkáni tumorů byla provedena analýza mikrosatelitů analýzou markerů D3S1289 a D3S1560 K analýze byl použit přístroj ABI PRISM 1300 AVANT. Výsledky byly korelovány s klinickopatologickými charakteristikami nádorů a průběhem onemocnění.

Výsledky: Marker D3S1289 byl informativní u 82,5 % pacientů (52/63), D3S1560 u 84,1 % pacientů (53/63). Ztráta heterozygoty (LOH) v D3S1289 byla detekována u 57,1 % (36/63) a v D3S1560 u 55,6 % (35/63) sledovaných. Současný nálezh LOH v obou lokusech byl detekován u 42,9 % (27/63). U obou pacientů s nádorem G3 byla prokázána LOH v obou lokusech. Během průměrné doby sledování 29,57 měsíců se objevila progresse onemocnění u 7 pacientů. U každého z nich byla prokázána LOH alespoň v jednom lokusu, u 4 z nich pak v obou lokusech (NS).

Závěr: LOH v lokusech D3S1560 a D3S1289 je častým nálezem ve tkáni lokalizovaného konvenčního renálního karcinomu. Byť jsme zatím neprokázali statisticky významný rozdíl, ukazují naše výsledky určitou korelaci mezi nálezem LOH a průběhem onemocnění.

Práce byla podpořena VZ 0021620808.

PŘÍNOS FDG-PET/CT V DIAGNOSTICE NÍZCE VIRULENTNÍ INFEKCE CÉVNÍ PROTÉZY

Autoři: Miroslav Špaček, ²Bělohávek, O., ²Votrubová, J., ³Šebesta, P., ¹Tošovský J.
Školitel: doc. MUDr. Jan Tošovský, CSc., ¹II. chirurgická klinika - kardiovaskulární chirurgie, VFN, 1. LF UK, ² PET centrum, Nemocnice Na Homolce, ³oddělení cévní chirurgie, Nemocnice Na Homolce

Cíl práce: Infekce cévní protézy je jednou z nejzávažnějších komplikací v kardiovaskulární chirurgii. Standardně užívané diagnostické metody často selhávají právě v případech nízce virulentní infekce cévní protézy a nalezení vhodné diagnostické modality je tedy stále výzvou. Cílem práce je vyhodnocení citlivosti nové hybridní diagnostické modality FDG-PET/CT v této indikaci.

Materiál a metodika: Čtyřicet pět pacientů, nositelů 53 cévních protézy, podstoupilo kontrastní FDG-PET/CT vyšetření pro podezření na nízce virulentní infekci cévní protézy, v průměru 16 měsíců (1-33) po provedené tepenné rekonstrukci. Analyzované parametry PET byly: vizuálně posouzené fokální a difúzní uptake FDG (negativní-mírný-intenzivní) a poměrné hodnoty maximální intensity FDG uptake v oblasti cévní náhrady vztažené k referenční oblasti suparenální aorty. K posuzovaným CT parametrům patří transaxiální plocha infiltrátu, iritace ohraničení ložiska předpokládané infekce a přítomnost pseudoaneurysmatu. Dále jsme provedli analýzu hodnot CRP a leukocytózy v době vyšetření. Všechna

data jsme porovnali se zlatým standardem – chirurgickém nálezu při reoperaci (39 graftů) nebo, v případě negativních nálezů, klinické sledování (14 graftů) s průměrnou dobou trvání 15 měsíců (3-26). Diagnostická hodnota sledovaných parametrů byla vyhodnocena pomocí statistických testů. Přesnost metody je vyjádřena jako senzitivita, specifická, negativní a pozitivní prediktivní hodnota, včetně 95% confidence intervalu.

Výsledky: Nález infekce cévní protězy byl pozitivní ve 40 případech, ve 13 pak negativní. Vizuálně posouzený fokální uptake FDG se ukazuje jako nejlepší diskriminátor ($p < 0.0001$); ostatní vyhodnocené parametry neposkytují další zásadní informaci ($p > 0.1$) (stepwise logistic regression). Vizuálně posouzený mírný FDG uptake ve 13 případech (25%) odpovídal peroperačnímu nálezu 7 infikovaných a 6 neinfikovaných graftů, tedy takový nález byl shledán jako nedignostický. Všech 6 případů negativních PET nálezů bylo potvrzeno negativním klinickým sledováním. V 34 případech intenzivního fokálního uptake FDG byla infekce potvrzena operačním nálezem v 33 případech. Tyto výsledky znamenají senzitivitu metody 100% (CI: 87-100%), specifickou 86% (CI: 42-99%), PPV 97% (CI: 93-100%), NPV 100% (CI: 52-100%). Všechny ostatní sledované parametry a jejich vzájemné kombinace nepřinášejí další zpřesnění.

Závěr: Vizuálně vyhodnocený FDG uptake je nevhodnější parametr PET/CT při diagnostice málo virulentní infekce cévní protězy. Mírný FDG uptake je hodnocen jako nedignostický (25%). Žádný, resp. vysoký FDG uptake (75%) velmi dobře vyloučí, resp. potvrdí infekci. CT část vyšetření je zcela zásadní pro přesnou lokalizaci patologického procesu, avšak nepřinášejí žádnou významnou informaci pro rozhodnutí, zda se jedná či nejedná o infekci cévní náhrady.

DEPRESSION IN PATIENTS OF SMOKING CESSATION CLINIC IN PRAGUE

Authors: MUDr. Lenka Štěpánková¹, Králíková E.²

Supervisor: MUDr. Eva Králíková, CSc., ¹ 3rd Medical Department, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, ² Institute of Hygiene and Epidemiology and 3rd Medical Department First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital

Epidemiological research - What's new in nicotinic receptor research and what does it contribute towards understanding nicotine dependence

Introduction and aim: A complex and circular relationship between smoking, depression and other psychiatric illnesses has been well documented - psychiatric comorbidity is often seen in smokers. A high number of psychiatric patients are smokers and high rates of anxiety and depression exist usually in patients attending smoking cessation clinics. Our aim is to evaluate psychiatric comorbidity (depression) in our patients, and to assess different characteristics in depressed and non-depressed patients. **Methods:** We analyzed sample of our patients concerning their age, gender, level of nicotine dependence (Fagerström Test of Nicotine Dependence, FTND), and CO in expired air at baseline visit. Psychiatric comorbidity was assessed by asking every patient. Our sample included all patients with current depression (treated by pharmacotherapy), who visited our clinic (first visit) during 2005. We compared characteristics of this sample with all patients enrolled in 2005. **Results:** In our patients (N = 379) we found = 16.62% (63/379) patients with current depression. The average level of nicotine dependence (FTND score 0 - 10) in depressed patients was 6.36, compared to 5.38 in the whole group. Concerning the gender, 70 % of depressed patients were female, and 30 % male, while we had 50 % of both female (190/379) and male (189/379) patients in the whole group. Average number of visits in the depressed sample was higher: 4.68 compared to 3.31 in all patients. Concerning pharmacotherapy, in depressed patients nicotine replacement therapy (NRT) was used in 84 % (53/63) compared to 91 % (344/379) in the whole group, and/or bupropion was used in 10 % (6/63) and 6 % (23/379), respectively. **Conclusion:** About each sixth patient of our clinic suffered with depression compared to 5 % of depression point prevalence in the Czech population (each twentieth). Depressed smokers were more nicotine dependent and heavier smokers than the rest of our patients, and were more likely to be female.

CHROMOSOMOVÉ ABERACE V PLASMATICKÝCH BUŇKÁCH U NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM

Autoři: Jana Tajtlová, Zemanová Z., Pavlišťová L., Grosová L., Berková A., Michalová K.

Školitelky: prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc., RNDr. Zuzana Zemanová, CSc., Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Mnohočetný myelom (MM) je heterogenní onemocnění, které se vyznačuje individuálními rozdíly v klinických projevech, léčebné odezvě a prognóze. V poslední době je za jeden z nejdůležitějších prognostických faktorů u nemocných s MM považován nález klonálních chromosomových aberací v plasmatických buňkách. K nejčastějším a prognosticky nejvýznamnějším cytogenetickým nálezům patří zejména delece RB1 genu v oblasti 13q14 a/nebo ztráta celého chromosomu (střední až špatná prognóza) a dále translokace IgH genu v oblasti 14q32. Gen IgH vstupuje do translokací s různými partnerskými geny a tyto přestavby jsou většinou spojeny s velmi špatnou prognózou. Výjimku tvoří translokace t(11;14)(q13;q32), která bývá spojena s delším celkovým přežitím a je považována za příznivý prognostický ukazatel. K dalším nálezům patří amplifikace oblasti 1q21 a del(17)(p13.1), které jsou spojovány se špatnou prognózou. Pacienty s nově diagnostikovaným MM vyšetřujeme metodou interfázické fluorescenční in situ hybridizace v kombinaci s imunofluorescenčním značením plasmatických buněk (cIg-FISH). Používáme lokus-specifické DNA sondy (Abbott-Vysis™, KREATECH) a specifické protilátky značené fluorochromy (Vector Laboratories). Zaměřili jsme se na identifikaci aberací dlouhých ramen chromosomu 13, přestavby genu IgH, amplifikace oblasti 1q21 a delece genu p53.



Metodou cIg-FISH jsme vyšetřili celkem 240 nově diagnostikovaných pacientů a chromosomové aberace jsme detekovali celkem u 194 nemocných (80,8%). Aberace chromosomu 13 jsme prokázali u 122 nemocných (50,8%), přestavby genu IgH jsme potvrdili u 155 pacientů (64,6%), amplifikaci oblasti 1q21 jsme našli u 44 pacientů (40,7%) a delecí genu p53 jsme identifikovali u 19 pacientů (17,6%). Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy porovnááme s klinickými parametry.

Metoda cIg-FISH významně přispívá k detekci chromosomových aberací v plasmatických buňkách u nemocných s MM. Jejich identifikace upřesňuje diagnózu, stanovení prognózy a lze předpokládat, že povede i k individualizaci léčby dle stanoveného rizika.

Podporováno grantem IGA NR/8183-4 a MSM 0021620808.

PŘÍNOS INTRACELULÁRNÍ KONCENTRACE METOTREXÁTU PRO TERAPII DĚTÍ S JUVENILNÍ IDIOPATICKOU ARTRITIDOU

Autoři: Jana Tuková, Miloš Hroch, Jaroslav Chládek, Pavla Doležalová

Školitelka: doc. MUDr. Pavla Doležalová, CSc., Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Úvod: Metotrexát (MTX) představuje neúčinnější lék 2. volby v pediatrické revmatologii. Pro nekonstantní farmakokinetiku je mezi jednotlivými pacienty velká variabilita v odpovědi na léčbu. Klinický účinek závisí na dávce. Způsob zahájení terapie má zásadní klinický dopad. Může docházet k oddálení klinického účinku poddáváním nebo naopak ke zvýšení rizika toxicity agresivní vysokodávkovou terapií. Dle předchozích studií může koncentrace polyglutamátů MTX v erytrocytu (EMTX) odpovídat biologické dostupnosti MTX a jejich stanovení by mohlo přispět v časném období vedení terapie stejně jako v dalším monitorování terapie. Cílem naší práce je posoudit přínos stanovení EMTX pro optimální dávkování na základě porovnání hodnot EMTX mezi dětmi dobře reagujícími na terapii a nereagujícími dostatečně.

Metodika: 28 dětí s juvenilní idiopatickou artritidou jsme rozdělili podle odpovědi na léčbu dle opakovaného standardizovaného hodnocení aktivity choroby (core set of JIA outcome measures; pedACR). Terapeutická odpověď byla úplná (inaktivní onemocnění), částečná († pedACR 50) a žádná odpověď (‡ pedACR 30). Pacienti dostávali stabilní dávku léku minimálně 6-8 týdnů, její velikost byla titrována podle klinického účinku. EMTX jsme měřili pomocí kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí.

Výsledky: Děti s částečnou a nedostatečnou odpovědí dostávaly vyšší dávky MTX, přesto se jejich EMTX neliší od dětí s dobrou odpovědí. Po přepočtu EMTX na dávku 10 mg/m² se EMTX mezi skupinami liší (P=0,02) a jsou nižší u dětí s nedostatečnou odpovědí oproti dětem s dobrou odpovědí (P<0,05, post-hoc test).

Závěr: Předběžné výsledky této studie ukazují rozdílnou kinetiku MTX u dětí dobře a nedostatečně odpovídajících na léčbu. Děti s nedostatečnou odpovědí možná vyžadují vyšší terapeutické koncentrace EMTX. Hledání účinné dávky s využitím EMTX by mohlo být přínosné. Dokud tento předpoklad nebude potvrzen prospektivní studií, doporučujeme měření EMTX pouze k ověření compliance pacientů.

SNÍŽENÁ AKTIVITA KATALASY U PACIENTŮ V SEPSI

Autoři: Lucie Vávrová, Jana Kodydková, František Novák, František Novák, Jr., Aleš Žák

Školitelka: RNDr. Eva Tvrzická, CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Při metabolických procesech v organismu vzniká řada reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species, RONS), které hrají významnou roli v patogenezi celé řady chorobných stavů. Předpokládá se, že RONS přispívají významně ke vzniku atherosklerosy, ischemické choroby srdeční, šedého zákalu, diabetu mellitu, zánětů a septických stavů a podporují stárnutí organismu. Sledování vzniku volných radikálů a jejich působení v organismu se proto stalo velmi aktuální problematikou moderní medicíny. Katalasa (CAT) je enzym, který se nachází téměř ve všech aerobních buňkách a je zodpovědný za jejich ochranu před toxickým účinkem peroxidu vodíku. Katalysuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Studie byla zaměřena na sledování pacientů se sepsí a srovnání se dvěma kontrolními skupinami – kriticky nemocnými osobami bez přítomnosti sepse a zdravými kontrolami.

Metodika: Kontrolní skupiny byly párovány podle pohlaví a věku (zdravé osoby) a podle pohlaví, věku a skóre APACHE II (kriticky nemocní bez sepse). Aktivita enzymu byla stanovena v erytrocytech kinetickou spektrofotometrickou metodou.

Výsledky: Ve studii byly prokázány snížené hodnoty aktivity CAT v počátcích sepse oproti ambulantním kontrolám (162.4±20.2 kU/g Hb vs. 224.5±28.8 kU/g Hb, n=13, p<0.001), v průběhu uzdravování byl zaznamenán trend růstu hodnot aktivity CAT a pacienti po uzdravení dosahovali hodnot srovnatelně vysokých se zdravými kontrolami. Hodnoty aktivit katalasy neseptických kriticky nemocných pacientů a zdravých kontrol se statisticky významně nelišily. Byla zjištěna významná negativní korelace mezi koncentrací CRP a aktivitou CAT (r=-0.383, p<0.01) a pozitivní korelace mezi koncentrací železa v séru a aktivitou CAT (r=0.537, p<0.0001).

Závěr: Do budoucna by stanovení aktivity katalasy mohlo významně pomoci v diagnostice sepse.

Podporováno grantem Ministerstva zdravotnictví ČR č. NR/8943-4 IGA a výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. MSM 0021620820.

TESTOVÁNÍ BDĚLOSTI METODOU PVT-192 U ZDRAVOTNÍCH SESTER VE SMĚNNÉM PRACOVNÍM PROVOZU

Autoři: Jana Volná, David Kemlink, Karel Šonka

Školitel: prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc., Neurologická klinika, 1. LF UK a VFN

Úvod: Poruchy spánku či jiná onemocnění se vyskytují až u 80% osob pracujících ve směnném provozu. Zaměřili jsme se na testování parametrů bdělosti zdravotních sester.

Metodika: K testování byl použit Performance Vigilance Task (PVT-192). PVT je ambulantní metoda užívaná k testování vlivu spánkové deprivace, poruch pozornosti a denní spavosti. Testovaná osoba reaguje na nepravidelně se objevující světelné impulsy na displeji přístroje. Test trvá 10 minut a PVT software umožňuje statisticky zhodnotit reakční časy a počet chyb v průběhu testu. Součástí vyšetřování byla vizuální analogová škála ospalosti (VAS) a vybrané spánkové anamnestické údaje. Vyšetřeno bylo celkem 20 zdravotních sester pracujících ve 12-ti hodinovém směnném pracovním provozu neurologické kliniky. Vylučovacími kritérii byly léky ovlivňující spánek, anamnesticky přítomná spánková porucha a komorbidita. Každá ze sester podstoupila celkem 4 PVT testy, před nástupem do služby (denní či noční) a po ní.

Výsledky a závěr: Medián reakčního času (RT) byl před denní službou 261,3ms (SD±38,7), po denní 260,1ms (SD±33,1), před noční směnou 251,3ms (SD±23,5), po noční 260,5ms (SD±26,1). Signifikantní byly rozdíly mezi RT před noční směnou a po ní a mezi RT obou večerních měření. Rozdíl v RT před a po službě je signifikantně vyšší po noční směně. Celkový počet chyb (TE) byl před denní směnou 10 (SD±2,3), po ní 25 (SD±5,4), před noční směnou 13 (SD±2,8), po noční 5 (SD±1,4). Signifikantní korelace byly nalezeny pro všechna měření, nejsilněji pak mezi TE po denní a po noční směně. Subjektivní hodnocení denní spavosti dle VAS bylo před denní směnou 3,3 (SD±2,2), po ní 3,5 (SD±2,8), před noční 3,1 (SD±2,4), po noční 5,9 (SD±2,3). Signifikantní byla korelace VAS před noční směnou a po ní a korelace rozdílu VAS mezi začátkem a koncem směny po noční směně oproti denní. Zjistili jsme dále negativní korelace věku či počtu dětí a doby spánku po noční službě, výsledky testů u kuřáček a nekuřáček nebyly statisticky významné. Je patrné, že cirkadiánní aspekt hraje v testování velkou roli.

ANALÝZA STRUKTURNÍCH ZMĚN CHROMATINU NA MYŠÍM MODELU GENETICKÉ MODIFIKACE CHROMATIN-REMODELUJÍCÍ ATPÁZY SNF2H.

Autoři: Mgr. Karina Vargová, Kokavec J., Podskočová J., Majumdar R., Skoultchi A. I., Stopka T.

Školitel: Tomáš Stopka, MUDr. PhD., Ústav patologické fyziologie 1. LF UK

DNA a histonové proteiny tvoří v buněčném jádře opakující se chromatinové jednotky složené z osmi histonových proteinů a 147-bázového úseku DNA označované jako nukleozóm. Chromatin-remodelující faktor Snf2h z helikázové podrodiny ISWI (Imitation SWItch) je schopen sestavit a posunovat nukleozómy po DNA, v procesu označovaném v literatuře jako „nucleosome assembly“ a „sliding“. Snf2h je nepostradatelný pro embryonální vývoj a krvetvorbu (Stopka 2005). Zjistili jsme, že Snf2h je lokalizován jak v heterochromatinu tak i v transkripčně aktivním euchromatinu. To podporuje předchozí práce o roli Snf2h v progresi buněčného cyklu skrze S-fázi vedle dalších potenciálních funkcí v regulaci genové exprese. Studujeme strukturu chromatinu metodou konfokální mikroskopie v myších embryích s inaktivovaným Snf2h, jež způsobuje embryonální letalitu v období časně gastrulace. Naším hlavním cílem je studovat roli Snf2h v průběhu ontogeneze a v dospělých tkáních, a proto jsme připravili tři kondicionální knock-out (cKO) konstrukty, které nám umožňují řízenou delecii vybraných exonů v ATPázové doméně Snf2h v různých tkáních a stádiích vývoje. Mechanismem homologní rekombinace v embryonálních kmenových buňkách jsme připravili řadu buněčných linií pro blastocystovou injekci a nyní pracujeme na tvorbě gen-inaktivovaných myší ve fázi křížení chimerických myší. Pro studium specifické role ATPázové domény Snf2h jsme metodou cílené mutagenézy připravili 2 mutace ATP-vazebného místa (K210R) a DExH boxu (D307A). Genetické modely funkce Snf2h v myši přispějí k poznání role remodelace chromatinové struktury.

Granty: NR9021-4, 301/06/093, LC06044, 2B06077.



SEKCE NELEKÁŘSKÁ-OŠETŘOVATELSKÁ

ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE NELEKÁŘSKÁ – OŠETŘOVATELSKÁ

- Bc. Holoubková Jana, DiS., 2. r.
- Bc. Novotná Jana, 2. r.
- Mgr. Vodehnalová Zuzana, 2. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

předseda: Mgr. Dana Jurásková, MBA

členové: doc. MUDr. Petr Bartůněk, CSc.



CENTRA PRO LÉČBU BOLESTI

Autorka: Bc. Jana Holoubková, DiS., 2. r.

Školitelka: PhDr. Helena Chloubová, Ústav teorie a praxe ošetřovatelství 1. LF UK

Úvod: Bolest má základní pozitivní obrannou a signální funkci organismu. Upozorňuje nás na poškození našeho těla, omezuje další namáhání a přetěžování. V určitých případech má bolest negativní význam, může stát vlastní nemocí, přináší nadbytečné utrpení vedoucí k rozvolnění rodinných a sociálních vazeb a ve svých důsledcích až ke změnám osobnosti. Jedná se především o ty případy, kdy intenzivní bolest je hlavním příznakem onemocnění a nebo kdy její délka trvání a intenzita často ani neodpovídají příčině a míře poškození. Zejména chronickou bolestí se v posledních letech zabývají Centra pro léčbu bolesti, která pomáhají nemocným trpícím chronickou bolestí tuto strast léčit a přistupují k ní individuálně, komplexně a multidisciplinárně.

Metody: Předmětem výzkumu bylo zhodnocení rozložení a popis hlavních funkcí Center léčby bolesti (CLB) v celé České Republice. Jako základní metoda kvantitativního neexperimentálního výzkumu bylo zvoleno dotazníkové šetření. Dotazníky byly rozeslány do všech akreditovaných pracovišť léčby bolesti, které byly zaregistrovány do 31. prosince roku 2006. Výzkum spočívající v dotazníkovém šetření byl anonymní a obsahoval 18 otázek. Dotazníkové šetření bylo doplněno o studium dokumentace v CLB v Plzni. Vybrala jsem 3 nejčastější ošetřovatelské kazuistiky, které jsou typické a velmi časté v léčbě chronické bolesti.

Výsledky: Bylo zjištěno, že v každém kraji fungují alespoň 2 pracoviště, která se specializují na léčbu bolesti, na 100 tisíc obyvatel připadá asi 1 CLB. Dále bylo zjištěno, že nevhodný životní styl je ve většině případů příčinou chronické bolesti. Mezi nejčastější faktory nezdravého životního stylu patřil nedostatek pohybu a s ním související obezita. Byl také patrný stálý nárůst klientely CLB, kdy od roku 2002. Věková hranice klientů s bolestí se stále rozšiřuje a ženy trpí chronickou bolestí více než muži. CLB navštěvují nejvíce lidé s neortopedickými diagnózami (převažuje vertebrogenní algický syndrom) a bolestí trpí nejvíce lidé v invalidním nebo starobním důchodu.

Závěr: Chronická bolest je stále ještě opomíjeným problémem a je často bagatelizována. Péče o tlumení a odstraňování bolesti musí být v souladu se zajištěním péče o potřeby nemocných. Důležitá je týmová práce a to nejen lékaře a sestry, ale vzájemná spolupráce, kde hlavní roli hraje pacient. CLB jsou neodmyslitelnou složkou komplexní péče o nemocné trpící chronickou bolestí.

KVALITA ŽIVOTA U LIDÍ S POSTUPNOU ZTRÁTOU ZRAKU

Autorka: Bc. Jana Novotná, 2. r.

Školitelka: PhDr. Helena Chloubová, Ústav teorie a praxe ošetřovatelství 1. LF UK

Má práce se zabývá problematikou lidí postižených vadou zraku. Jejich částečná nebo úplná ztráta schopnosti vizuálně se orientovat v našem světě s sebou nese nejrůznější obtíže, s nimiž se zejména starší lidé velmi špatně vyrovnávají. Některým z nich se zhoršila kvalita života, nedokázali se s údělem postupné ztráty zraku vyrovnat či se uzavřeli před okolím. Setkala jsem se s lidmi, kteří skrz svůj handicap nedokázali nalézt cestu a nový způsob života.

Metodika: Strukturovaný rozhovor vlastní konstrukce s audiozáznamem s volnými výpověďmi respondentů; Pozorování; Sledování dokumentace a anamnestických údajů; Kazuistiky

Výsledky: Po sdělení oftalmologické diagnózy uvádějí respondenti v nemocničním prostředí negativní prožívání. 22% těchto respondentů má problémy s vyrovnáním se se zrakovou vadou. Pouze 9% respondentů připouští, že se s vadou dokázali vyrovnat. 72% všech respondentů si myslí, že během jejich onemocnění zrakového ústrojí nedošlo k narušení sociálních vazeb s jejich blízkým okolím. 31% respondentů připouští, že nejzávažnější událostí v jejich životě byla smrt blízké osoby. Také 25% respondentů tvrdí, že nic tak závažného, jako je postižení zraku, nikdy nezažili. 66% respondentů dělá největší problém orientace a pohyb v cizím prostředí, čtení a práce v domácnosti. Nadpoloviční většinu respondentů (64%) tvoří lidé, kteří kompenzační pomůcky, určené lidem se zrakovým postižením nepoužívají. Stejný počet respondentů (64%) nenavštěvuje žádnou organizaci pro zrakově postižené. 72% respondentů je spokojeno se svým životem. 59% z nich uvádí, že jejich život neprobíhá podle jejich očekávání.

Závěr: Jelikož jsem sledovala respondenty po devět měsíců, vždy v tříměsíčních časových odstupech, mohu po zhodnocení říci, že došlo u respondentů k podstatným pozitivním změnám. Srovnávala jsem dvě skupiny respondentů. Respondenty oslovená v nemocničním prostředí a v rekvalifikačním centru. Mezi těmito skupinami byli patrné velké rozdíly. Respondenti v rekvalifikačním centru se lépe integrovali do běžné „společnosti“. Dělal si plány do budoucnosti, měli množství mimopracovních aktivit. Lépe se vyrovnávali s postižením zraku. Dokázali si připustit, že mají problémy a používali kompenzační pomůcky. Z toho vyplývá, že je zapotřebí, aby se na lidi s postupnou ztrátou zraku zaměřovala větší pozornost. Aby péče o ně byla kontinuální s návazností na mimooborovou spolupráci. Je potřeba zefektivnit metody, jakými jsou zrakově postiženým lidem podávány informace.

KVALITA ŽIVOTA OSOB S AFÁZIÍ - PSYCHOSOCIÁLNÍ ROVINA AFÁZIÍ

Autorka: Mgr. Zuzana Vodehnalová

Školitelka: doc. MUDr. Olga Dlouhá, CSc., Foniatriká klinika 1. LF UK a VFN

Afázie jako jedno z nejzávažnějších narušení komunikační schopnosti má přirozeně zcela zásadní dopad na psychické prožívání i sociální kompetence osob a afázií i jejich bezprostředního okolí. Z dostupných dat mapujících problematiku

cévních mozkových příhod lze odůvodněně předpokládat, že roste počet osob s afázií (trvale rostoucí počet hospitalizovaných pro cévní onemocnění mozku a klesající hospitalizační letalita), stejně jako life expectancy. Přibývá tedy osob s afázií v chronické fázi a mění se náhled na těžiště celé problematiky. Vystává klíčová otázka logopedické praxe: zda terapie, kterou našim klientům s afázií nabízíme, skutečně pozitivně dopadá na kvalitu jejich života a zdá se tedy efektivní. Koncept na zdraví vázané kvality života (HRQoL) nabízí holistický pohled na osobu s afázií a umožňuje měřit dopad afázie na kvalitu života. Přednáška nabízí úvodní vhled do problematiky kvality života osob s afázií a jejího měření, prezentaci používaných nástrojů měření a možností akcentace psychosociální roviny afázie v klinické praxi. Na Foniatričké klinice VFN a 1.LF je druhým rokem úspěšně realizován projekt skupinové reedukace osob s afázií, která pozitivně ovlivňuje nejen faktické, ale i psychické a sociální dovednosti osob s afázií.



Vítězové 8. ročníku studentské vědecké konference se sešli v Akademickém klubu 1. LF UK ve Faustově domě, aby převzali ceny.

VÍTEŽNÉ PRÁCE IN EXTENSO





Porotkyně soutěže – zleva doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc., a prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.



Vyhlášení soutěže se zúčastnili i členové porot – zleva doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc., prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc., prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc. a prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ TEORETICKÁ VÍTĚZNÉ PRÁCE

VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO SEKCE PREGRADUÁLNÍ – ČÁST TEORETICKÁ

1. místo: **Pavel Říha, 6. r.** – Institute for Biochemistry II. University of Frankfurt Medical School, Frankfurt am Main, Německo

Školitel: Priv. – Doz. Dr. med. Albert Smolenski

Název práce: „Major platelet activation and inhibition pathways converge on regulation of VASP and 14-3-3 interaction“

2. místo: **Jan Beneš, 5. r.** – Fyziologický ústav 1. LF UK

Školitel: **doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.**

Název práce: „Signalizační změny u laboratorní myši vyvolané vyřazením genu c-fos“

3. místo: **Marie Morysová, 4. r.** – Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Školitel: odb. as. MUDr. Šeda, Ph.D., CSc.

Název práce: „Funkčně genomická analýza definovaného úseku chromozomu 4 spontánně hypertenzního kmene potkana u dvou nových kongenních kmenů“



1. MÍSTO

MAJOR PLATELET ACTIVATION AND INHIBITION PATHWAYS CONVERGE ON REGULATION OF VASP AND 14-3-3 INTERACTION

Author: Pavel Říha¹

Supervisor: Priv.-Doz. Dr. med. Albert Smolenski²

¹ 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

² Institute of Biochemistry II, University of Frankfurt Medical School, Frankfurt am Main, Germany



Pavel Říha

Key Words: platelets / ADP / thrombin / NO / PGI₂ / 14-3-3 / VASP

INTRODUCTION

Blood platelets are discoid nucleate cell fragments involved in cellular mechanisms of blood clot formation, repair of endothelium and regulation of inflammation [1]. Blood platelets are of the central importance in the development of arterial thrombosis and cardiovascular diseases. No other single cell type is responsible for as much morbidity and mortality in humans as platelets [2, 3].

Endothelium-derived nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) are potent physiological inhibitors of platelet adhesion and aggregation [4-6]. NO and PGI₂ activate guanylyl- and adenylyl cyclases in platelets. Synthesized cGMP and cAMP activate cGMP- and cAMP-dependent protein kinases (cGK and cAK, respectively) that phosphorylate substrate proteins. Nevertheless, few direct connections between NO and PGI₂ triggered protein phosphorylation and platelet inhibition have been revealed yet [7].

VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) is one of major targets of NO and PGI₂ signalling in platelets. VASP is a regulator of actin cytoskeleton rearrangements. It protects actin barbed ends from capping and thus promotes actin polymerization, formation of filopodia and platelet shape change. VASP comprises of N-terminal Ena/VASP homology domain 1 (EVH1), central proline-rich region (PRR) and C-terminal Ena/VASP homology domain 2 (EVH2). EVH1 binds proteins containing FPPPP-motifs and plays an essential role in VASP targeting to focal adhesions. PRR interacts with profilin, Src-homology domains and WW-domains. EVH2 binds G- and F-actin, protects actin barbed end against capping and its coiled-coil region mediates tetramerization of VASP [8-10]. NO and PGI₂ trigger phosphorylation of VASP on serine 157, serine 239 and threonine 278. Since phosphorylated VASP does not protect actin barbed end against capping, actin filament assembly diminishes and platelet shape change is inhibited [11-13].

Many protein phosphorylation effects on signalling are mediated by 14-3-3 proteins [14]. 14-3-3 proteins constitute a ubiquitously expressed evolutionary conserved exclusively eukaryotic protein family. 14-3-3 proteins bind phosphoserine and phosphothreonine motives specifically. An interaction with 14-3-3 proteins causes conformational changes or occlusions of specific domains of target phosphoproteins. This results in modulation of enzymatic activity, localization and interactions of target phosphoproteins [14, 15]. 14-3-3 proteins form homo- and heterodimers. 14-3-3 isoforms β , γ and ζ are highly expressed in platelets [16]. In spite of more than 200 interaction partners of 14-3-3 proteins have been identified in human cells [17], only two has been described in human platelets: GPIb (a part of the von Willebrand factor receptor [18]) and Rap1GAP2 (an inhibitor of integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ dependent platelet adhesion and aggregation [7, 19]). In order to yield a better understanding of molecular mechanisms of platelet activation and thrombus formation, we identified 14-3-3 proteins as VASP binding partners and assessed the regulation of VASP/14-3-3 interaction in human platelets.

MATERIALS AND METHODS

Materials – Human thrombin, ADP, sodium-nitroprusside (SNP) and forskolin were obtained from Sigma, PGI₂ was from Cayman Chemical. Vardenafil was donated by Bayer Pharma. Antibodies anti-FLAG (Sigma), anti-myc (Upstate), anti-VSV P5D4 (Sigma), anti-VASP M4 (immunoGlobe), anti-VASP 16C2 (Upstate) were used for protein detection. Secondary antibodies HRP-coupled goat-anti-rabbit and goat-anti-mouse were from Dianova. Protein A/G Agarose was from S.C. Biotechnology.

Mutagenesis – Site-directed mutagenesis of VASP was performed by polymerase chain reaction amplification of VSV-VASP-pcDNA3 using mutagenic primer pairs, Pfu DNA polymerase (Stratagene), digestion with DpnI (Fermentas) and transformation in XL-10 Gold bacteria.

Fusion proteins – 14-3-3 β and 14-3-3 ζ cDNAs were cloned into pGEX-4T3 vector (Amersham) containing glutathion-S-transferase (GST) cDNA. GST-14-3-3 fusion proteins were expressed in E. coli BL21 and purified on GSH-sepharose (Amersham).

Cell culture and transfection – COS-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) at 37°C and ambient air supplemented with 5% CO₂. Transient transfections of COS-1 cells were performed with DEAE-dextran. 6×10⁵ cells were seeded per 10 cm dish. On the

following day, cells were washed with PBS and expression plasmids were applied in 5.7 ml serum-free medium mixed with 300 μ l of DEAE-dextran (1 mg/ml stock) and 12 μ l chloroquine (100 mM stock). After incubation for 2 hours, the transfection mixture was removed and the cells were cultured in DMEM with 10% FCS and 1% P/S for 24 – 48 hours prior to use.

Platelet preparation – Venous blood was drawn from healthy volunteers taking no medications, who gave their informed consent according to the declaration of Helsinki. Washed platelets were obtained by sequential centrifugation as previously described [20].

Lysate preparation – Adherent COS-1 cells were detached by scraping with a rubber policeman and washed 3 times with PBS. The lysates were prepared resuspending washed platelets or washed cells in ice-cold lysis-buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% triton, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ with phosphatase inhibitors (1 mM Na_3VO_4 ; 50 mM NaF; 5 mM $Na_4P_2O_7$) and protease inhibitors (2 μ g/ μ l aprotinin; 1 μ g/ μ l leupeptin; 0.1 mM PMSF). After 20 minutes, the lysates were centrifuged at 14000 g for 20 minutes to remove insoluble material.

Co-immunoprecipitation and pull-down experiments – Proteins were immunoprecipitated from 500 μ l of cell lysate by corresponding antibody (amount according to the manufacturer's instructions) and 5 μ l Protein A/G Agarose at 4 °C overnight. In pull-down experiments, 5 μ l of GSH-sepharose bead suspension saturated with GST-14-3- β , GST-14-3- ζ or GST-GFP were added to 500 μ l of platelet or cell lysate and incubated at 4 °C overnight. The beads were washed 5 times with the lysis-buffer before adding 20 μ l 3 \times Laemmli-buffer and boiling for 5 minutes. Proteins were separated by SDS-PAGE and identified by immunoblotting as described before [19]. All shown experiments were performed at least 3 times and produced similar results.

RESULTS

14-3-3 interaction with endogenous VASP

14-3-3 proteins were identified as binding partners of VASP by pull-down assays in human platelet lysates. 14-3- β and ζ isoforms, both highly expressed in platelets [16], bound to the endogenous VASP with a similar affinity, while control

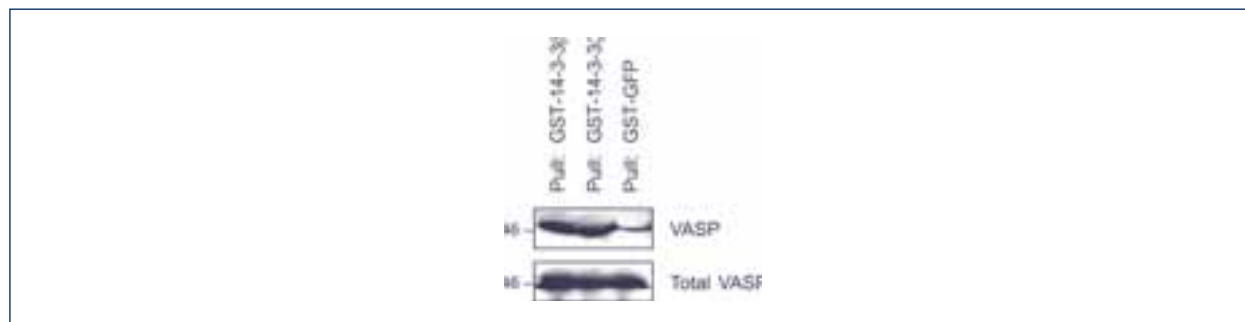


FIGURE 1: BINDING OF ENDOGENOUS VASP TO 14-3-3 PROTEINS

Lysate of freshly isolated washed human platelets was incubated with equal amounts of GSH-sepharose coupled fusion proteins GST-14-3- β , GST-14-3- ζ and GST-GFP as a control. Bound proteins were eluted from beads and detected with an antibody specific for VASP. The lower panel shows a VASP expression control.

GST-GFP fusion protein did not interact with VASP (Fig. 1).

Mapping of VASP/14-3-3 binding site

In order to identify 14-3-3 binding site(s), we tested 14-3-3 binding to separated VASP domains EVH1, EVH1-PRR, PRR-EVH2 and EVH2. Further, we assessed 14-3-3 binding to not phosphorylatable serine or threonine to alanine point mutants of previously described VASP phosphorylation sites serine 157, serine 239 and threonine 278 [11] either alone or in combination (VASP-S157A, VASP-S239A, VASP-T278A or VASP-S157A-S239A, VASP-S157A-S239A-T278A). However, only subtle differences in VASP/14-3-3 binding were observed in co-immunoprecipitation and pull-down experiments that did not allowed identifying 14-3-3 binding site(s) (data not shown).

Regulation of VASP/14-3-3 interaction by platelet activation pathways

In order to assess the regulation of VASP/14-3-3 interactions, intact human platelets studied *ex vivo* were treated by ADP and thrombin and the VASP/14-3-3 interaction was analysed in pull-down experiments. 14-3-3 precipitated VASP, phosphoserine 157 VASP (denoted as a shift in VASP mass from 46 to 50 kDa), phosphoserine 239 VASP and total

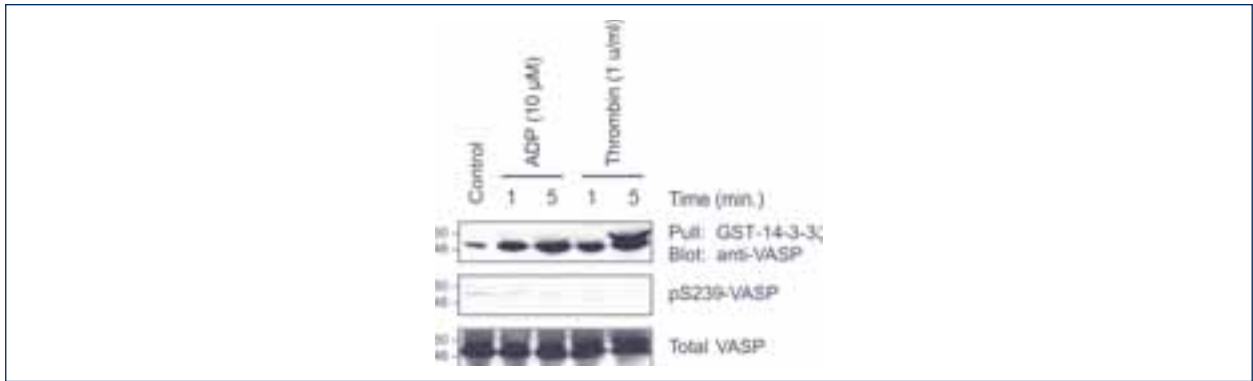


FIGURE 2: REGULATION OF VASP/14-3-3 INTERACTION BY ADP AND THROMBIN

Freshly isolated human platelets were treated without or with 10 μM ADP or with 1 u/ml thrombin for the indicated times. After lysis, equal amounts of GST-14-3-3 coupled to GSH-sepharose beads were used for precipitation. Bound proteins were eluted from the beads and visualized by immunoblot analysis with anti-VASP (upper panel). The middle panel shows phosphoserine 239 VASP (detected by phosphoserine 239 VASP specific antibodies) and the lower panel the expression level of protein VASP. Phosphoserine 157 VASP is apparent as a shift of VASP molecule mass from 46 to 50 kDa.

VASP were measured by immunoblot in platelet lysates. The ADP and thrombin triggered an increase in VASP/14-3-3 binding (Fig. 2).

Regulation of VASP/14-3-3 interaction by platelet inhibition pathways

Since VASP/14-3-3 interaction was enhanced by platelet activation pathways, the opposite effect of platelet inhibition pathways was hypothesized.

The cAMP production in platelets was stimulated by treatment with the receptor agonist PGI₂ or forskolin, a direct adenylyl cyclase activator. After the treatment, platelets were lysed and GST-14-3-3 was used to precipitate endogenous VASP. 14-3-3 precipitated VASP, phosphoserine 157 VASP, phosphoserine 239 VASP and total VASP were assessed. Both treatments reduced VASP/14-3-3 interaction (Fig. 3).

The cGMP production was stimulated by NO-donor SNP. After the treatment, platelets were handled as previously described. SNP treatment reduced VASP/14-3-3 interaction similarly as PGI₂ (Fig. 4). This effect was intensified by

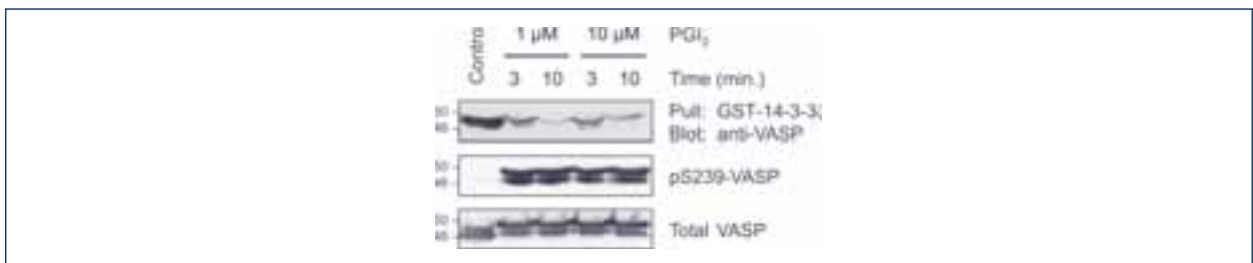


FIGURE 3: REGULATION OF VASP/14-3-3 INTERACTION BY PGI₂

Freshly prepared washed human platelets were treated with PGI₂ as indicated. Then platelets were lysed and analysed as described in Fig. 2.

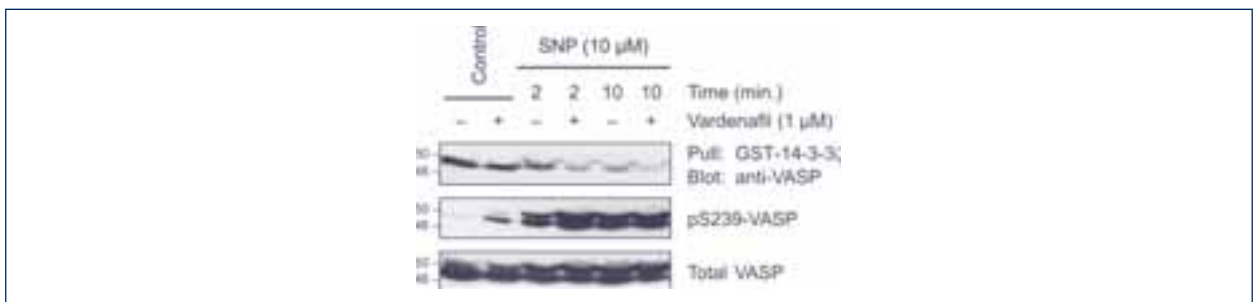


FIGURE 4: REGULATION OF VASP/14-3-3 INTERACTION BY NO

Washed human platelets were treated without or with vardenafil for 30 minutes followed by SNP treatment as indicated. Then platelets were lysed and analysed as described in Fig. 2.

preincubation of platelets with vardenafil (Fig. 4), a potent inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5) that hydrolyses cGMP efficiently [4].

DISCUSSION

We identified VASP as a new binding partner of 14-3-3 proteins in human platelets and resolved the regulation of VASP/14-3-3 interactions in human platelets.

VASP/14-3-3 binding site

The phosphorylation site necessary for 14-3-3 binding and the identity of an appropriate protein kinase remain to be determined.

The 14-3-3 binding site within VASP was not revealed likely due to an interference with endogenous wild-type VASP, involvement of probable not yet described VASP phosphorylation sites and possible multiple 14-3-3 binding sites within VASP molecules.

As VASP/14-3-3 interaction is increased by ADP and thrombin signalling, a potential kinase could be protein kinase B or C (PKB or PKC, respectively), since both are established elements of regulation pathways downstream of ADP and thrombin [6]. In fact, VASP can be phosphorylated on serine 157 not only by cAK and cGK, but also by PKC [21, 22]. PKC (and possibly PKB) might phosphorylate VASP on other residue(s) creating 14-3-3 binding site(s).

Effects of VASP/14-3-3 binding

Since VASP is involved in actin dependent processes in platelets and it is one of major targets of NO and PGI₂ signalling, tight regulation of VASP/14-3-3 binding by both platelet activation and inhibition pathways may represent an important molecular switch.

VASP/14-3-3 interaction could trigger changes in VASP localization, block cAK and cGK phosphorylation sites or allow VASP to interact with another 14-3-3 binding proteins. 14-3-3 proteins might play a role in an apparent shift of VASP molecule mass from 46 to 50 kDa by serine 157 phosphorylation as well.

New pathway intersection

Precise regulation of platelet activation is an essence for proper blood vessel functions and effective cardiovascular therapy. Our results indicate that the regulation of VASP/14-3-3 binding is a novel intersection of major platelet activation and inhibition pathways (Fig. 5). This finding defines a new mechanism that might contribute to both platelet activation and endothelial inhibition of platelet adhesion and aggregation. Our data could at least partially explain molecular basis of dipyridamole effects in platelets as well [23].

So far only three binding partners of 14-3-3 proteins have been described in platelets: GPIb [18], Rap1GAP2 [7] and

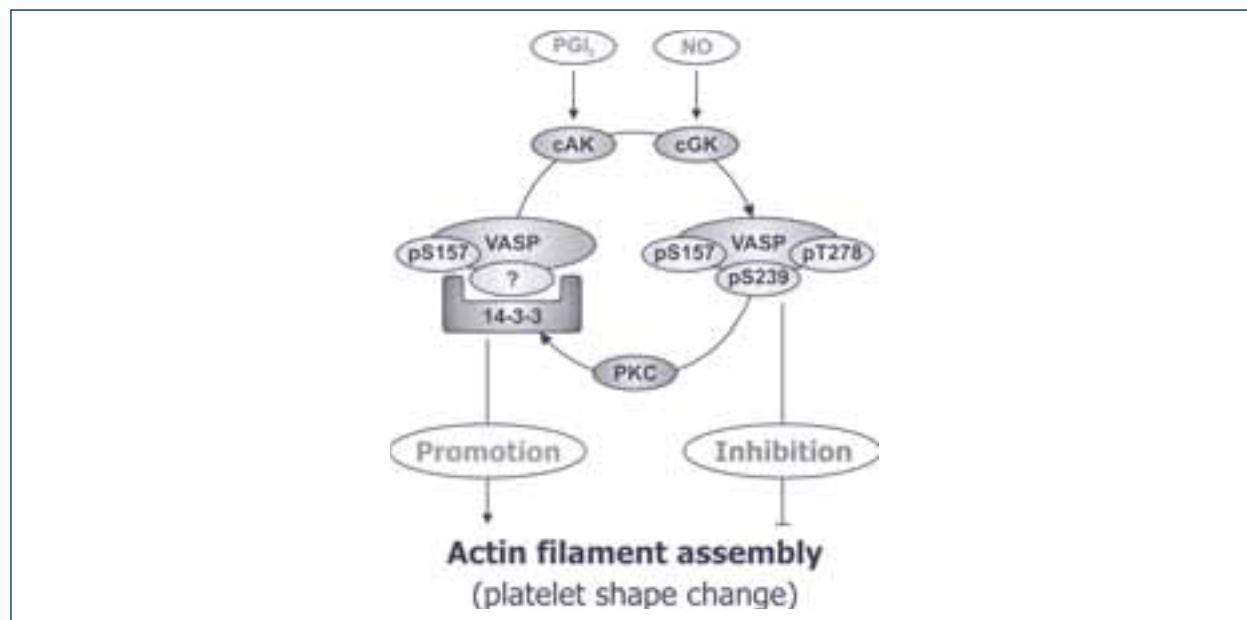


FIGURE 5: A NOVEL INTERSECTION OF PLATELET ACTIVATION AND INHIBITION PATHWAYS

ADP and thrombin signalling result in increase of VASP/14-3-3 binding, promotion of actin filament assembly and following platelet shape change. Stimulation of NO/cGMP and PGI₂/cAMP signalling pathways induce phosphorylation of VASP on serine 157, serine 239 and threonine 278 followed by detachment of 14-3-3 proteins. This multiple phosphorylated VASP does not protect actin barbed ends from capping and thus it inhibits actin filament assembly.



VASP. Interaction of all named proteins with 14-3-3 is regulated in a similar way. Platelet activation results in the increase of 14-3-3 binding to these proteins, whereas platelet inhibition diminishes 14-3-3 binding suggesting a new common molecular switch mechanism in human platelets.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank his tutor Albert Smolenski for the kind support and valuable advices, members of Platelet Signalling Group Oliver Danielewski, Meike Hoffmeister, Simone Kobe de Oliveira and Olga Neumüller and last but not least Prof. Werner Müller-Esterl. A special acknowledgement belongs to all blood donors and Bayer Pharma for providing vardenafil.

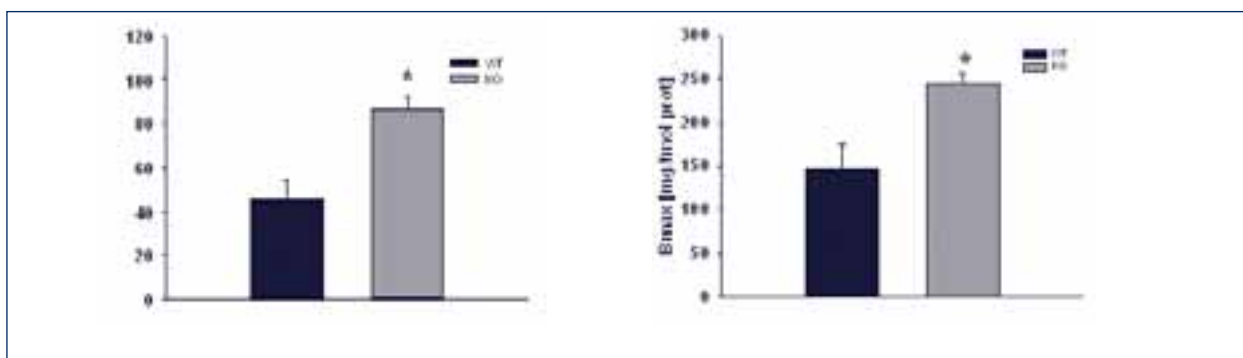
REFERENCES

1. Mannel, D.N., et al., Role of platelet adhesion in homeostasis and immunopathology. *Mol Pathol*, 1997. 50(4): p. 175-85.
2. Bhatt, D.L., et al., Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(1): p. 15-28.
3. Jackson, S.P., et al., Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(10): p. 775-89.
4. Feil, R., et al., Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, 2003. 93(10): p. 907-16.
5. Beavo, J.A., et al., Cyclic nucleotide research — still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(9): p. 710-8.
6. Abrams, C.S., Intracellular signaling in platelets. *Curr Opin Hematol*, 2005. 12(5): p. 401-5.
7. Riha, P., et al., Regulation of Rap1GAP2/14-3-3 binding is a novel intersection of activation and inhibition pathways in platelets. *Journal of Vascular Research*, 2006. 43(6): p. 576-576.
8. Bear, J.E., et al., Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, 2002. 109(4): p. 509-21.
9. Kwiatkowski, A.V., et al., Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(7): p. 386-92.
10. Barzik, M., et al., Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem*, 2005. 280(31): p. 28653-62.
11. Smolenski, A., et al., Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem*, 1998. 273(32): p. 20029-35.
12. Jensen, B.O., et al., Protein kinase A mediates inhibition of the thrombin-induced platelet shape change by nitric oxide. *Blood*, 2004. 104(9): p. 2775-82.
13. Hauser, W., et al., Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(14): p. 8120-5.
14. Bridges, D., et al., 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE*, 2005. 2005(296): p. re10.
15. Yaffe, M.B., et al., The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 1997. 91(7): p. 961-71.
16. Wheeler-Jones, C.P., et al., Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation. *Biochem J*, 1996. 315 (Pt 1): p. 41-7.
17. Pozuelo Rubio, M., et al., 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J*, 2004. 379(Pt 2): p. 395-408.
18. Dai, K., et al., A critical role for 14-3-3zeta protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications. *Blood*, 2005. 106(6): p. 1975-81.
19. Schultess, J., et al., Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. *Blood*, 2005. 105(8): p. 3185-92.
20. Danielewski, O., et al., The NO/cGMP pathway inhibits Rap 1 activation in human platelets via cGMP-dependent protein kinase I. *Thromb Haemost*, 2005. 93(2): p. 319-25.
21. Chitaley, K., et al., Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C. *FEBS Lett*, 2004. 556(1-3): p. 211-5.
22. Wentworth, J.K., et al., Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem J*, 2006. 393(Pt 2): p. 555-64.
23. Aktas, B., et al., Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling

in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. Stroke, 2003. 34(3): p. 764-9.

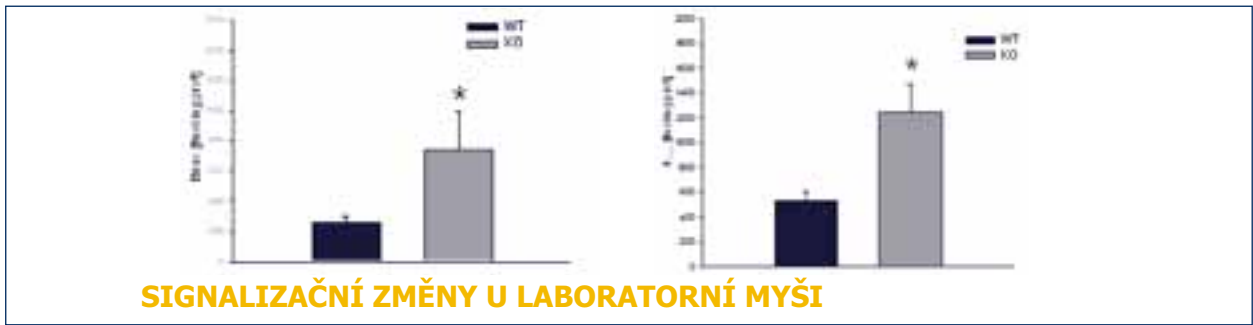


Jan Beneš

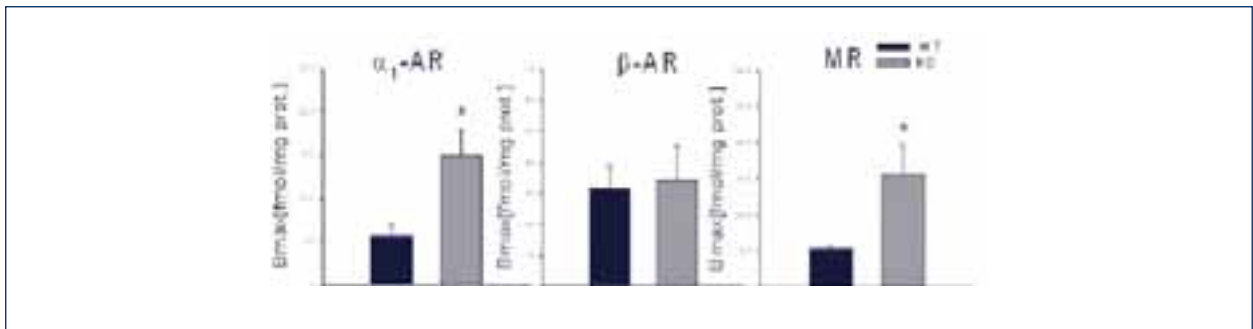




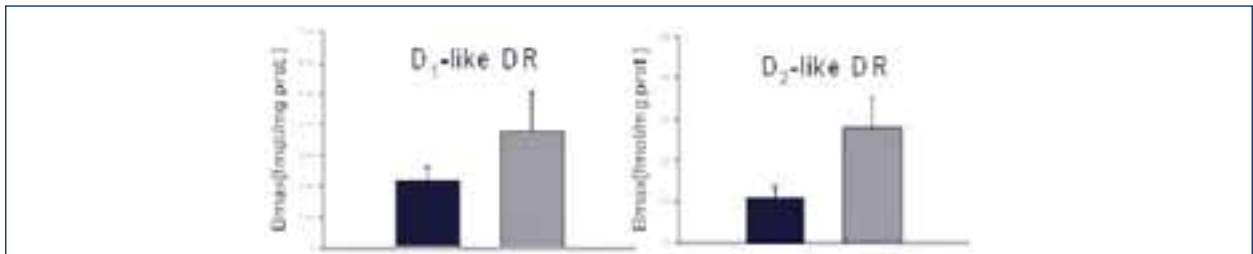
2. MÍSTO



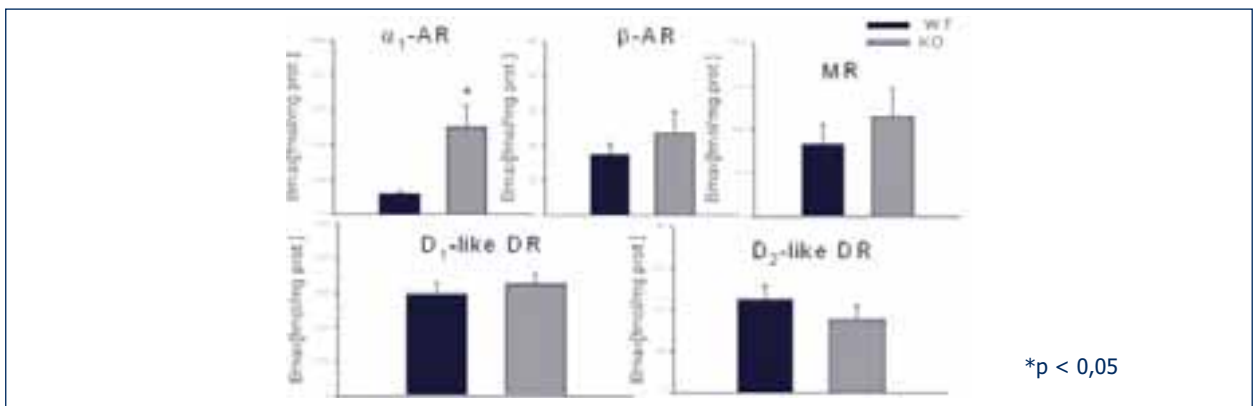
VYVOLANÉ VYŘAZENÍM GENU C-FOS



Autor: Jan Beneš

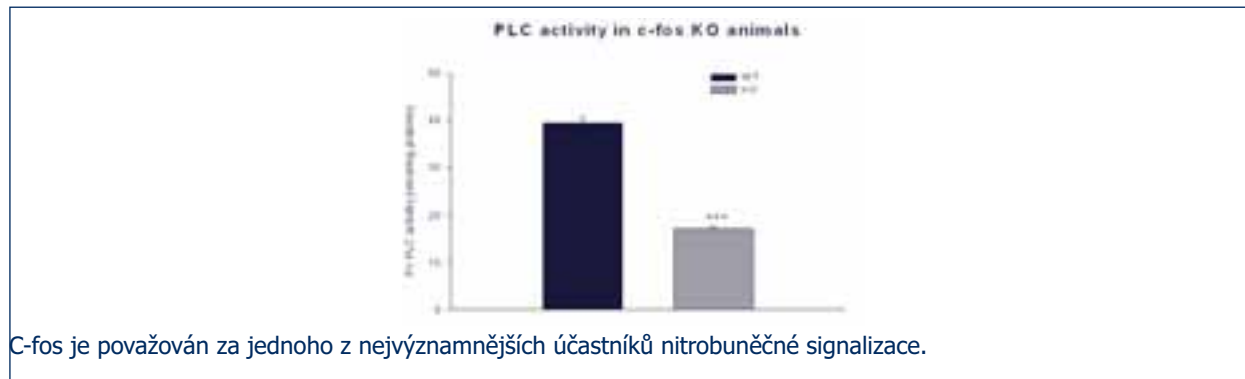


Školitel: doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D., Fyziologický ústav 1. LF UK



Přednosta: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., Fyziologický ústav 1. LF UK

ÚVOD



C-fos je považován za jednoho z nejvýznamnějších účastníků nitrobuněčné signalizace.

Ovlivnění c-fos má zásadní vliv pro správný průběh mnoha rozdílných fyziologických pochodů, diferenciace nervového systému, jeho správnou funkci, správnou diferenciaci osteoklastů a dalších orgánových systémů. C-fos hraje ale významnou roli i u mnoha patofyziologických mechanismů- účastní se mechanismů vedoucích k hypertrofii kardiomyocytů, hraje roli při reakci dřeně nadledvin na exogenní in- zult. Role c-fos byla ale popsána i u pochodů resultujících z abusu návykových látek- například tetrahydrocannabinolu (THC).

Cílem práce bylo popsat změny, které u laboratorní myši vyřazení genu c-fos vyvolá. Jelikož c-fos hraje tak zásadní roli v buněčné signalizaci, je s podivem, že tento knock-out není pro organismus letální. Cílem práce bylo zkoumat změny v signalizačních systémech, které knock-out genu c-fos vyvolá. Sledovali jsme vliv vyřazení genu c-fos na vazebné charakteristiky vybraných receptorů, které jsou spřaženy s G-proteiny. Studovány byly následující receptory: α_1 -adreno- receptory (AAR), β -adrenoreceptory (BAR), muskarinové receptory (MR), D_1 -like dopaminové receptory (D_1R), D_2 -like dopaminové receptory (D_2R). Dále jsem se zabývali změnami v aktivitě fosfolipázy C (PLC).

METODIKA

Vazebné vlastnosti všech receptorových systémů byly zkoumány následujícím způsobem: u všech receptorů byly provedeny saturační experimenty k získání saturačních křivek. Cílem bylo získat základní parametry, které popisují vazbu receptoru k ligandu- B_{max} a K_D . Dalším krokem bylo provedení jednobodových kompetic (OPA) při použití již saturující koncentrace ligandu. Pro vazebné pokusy byly použity následující radioligandy: 3H -prazosin pro α_1 -adrenoreceptory, 3H -CGP 12177 pro β -adrenoreceptory, 3H -QNB pro muskarinové receptory, 3H -SCH23390 pro D_1 -like dopaminové receptory a 3H -spiperon pro D_2 -like dopaminové receptory. Aktivita fosfolipázy C byla stanovena pomocí enzymatického stanovení měřením vzniklého radioaktivně značeného 3H -inositoltrisfosfátu (3H -IP₃) za použití substrátu 3H -fosfatidylinositolbisfos- fátu (3H -PIP₂). Pro pokusy byla použita pokusná zvířata ve stáří mezi 93- 107 dny. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu GraphPad Prism 3.0- použit byl studentův t-test.

VÝSLEDKY

V plicích i srdečních komorách byl pozorován signifikantní nárůst u beta-adrenergických a muskarinových receptorů. V obou případech se jednalo čistě o nárůst v počtu receptorů, vlastnosti receptorů (B_{max} a K_D) byly u WT i KO zvířat srovnatelné.

V CNS se efekt vyřazení genu c-fos projevil selektivněji. Obecně vzato, receptory, které aktivovaly signální dráhu vedoucí přes Gq-protein, fosfolipázu C a proteinkinázu C (AAR, MR) byly ovlivněny, zatímco ostatní (které aktivují nebo inhibují adenylylcyklázu: BAR, D_1R , D_2R) ovlivněny nebyly.

Výsledky v srdečních komorách

BAR
*p < 0,05

MR
*p < 0,05

Výsledky v plicích

Výsledky v kortexu



Výsledky v cerebellu

Zcela v protikladu k receptorovým hustotám byla aktivita fosfolipázy C v mozečku snížena.

Aktivita fosfolipázy C v cerebellu

***p < 0,001



DISKUSE

Tyto výsledky naznačují, že vyřazení genu c-Fos výrazným způsobem ovlivňuje nejenom hustotu receptorů, ale i samotnou aktivitu receptorů. Tyto mechanizmy mohou být chápány jako součást mechanismů, kterými se organismus vyrovnává s tak výrazným zásahem do signalizace, kterým je vyřazení genu c-Fos. Interpretace těchto změn není jednoznačně možná bez dalších pokusů. Faktem je, že c-Fos protein tvoří s dimery s proteiny s Jun proteiny (AP1 komplex), které slouží jako transkripční faktory pro expresi dalších genů. Při chybění proteinu c-Fos je AP1 komplex tvořen jinými proteiny. Zatímco proteiny fos rodiny (c-Fos, FosB, Fra-1) mohou tvořit dimery pouze s proteiny Jun rodiny, proteiny Jun rodiny (c-Jun, JunB, JunD) mohou tvořit buď heterodimer s fos proteinem nebo homodimer s jiným členem Jun rodiny. Předpokládáme tedy, že AP1 komplex tvořený proteiny, které suplují c-Fos ovlivňují transkripci mRNA pro další receptory. Na problematiku se je možné podívat i z jiného úhlu, je také třeba možné, že díky absenci c-Fos je porušen přenos signálu na úrovni G-proteinu (uncoupling), takže pro aktivaci PLC je potřeba větší množství receptorů s navázaným ligandem.

PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych chtěl poděkovat prof. Richardu Kvetňanskému, DrSc. za poskytnutí tkání. Evě Šimákové bych potom chtěl poděkovat za technickou pomoc. Tento projekt byl podpořen grantem GAUK 289/07.

LITERATURA

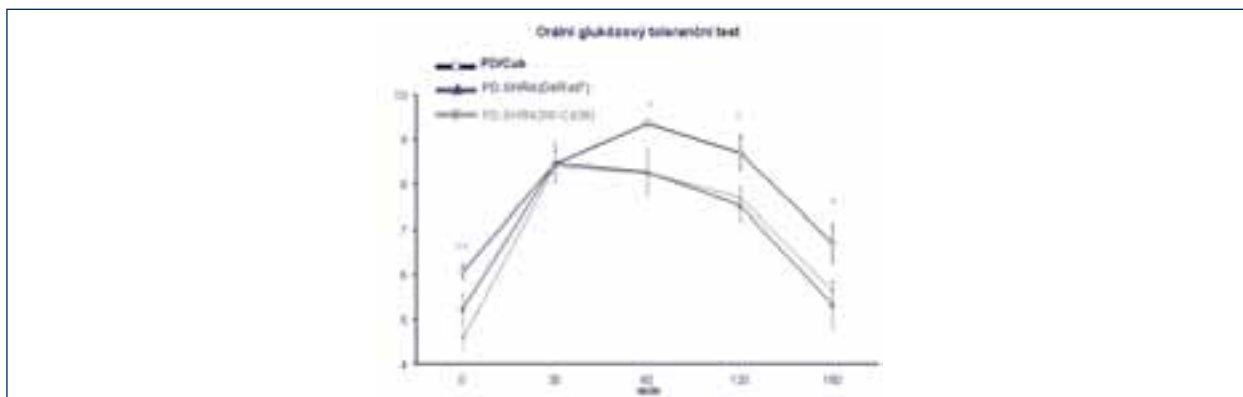
1. Zimmer HG.: Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of proto-oncogene expression. *J. Mol. Med.* 75: 849-859, 1997
2. Edwards DR.: Cell signaling and the control of gene-transcription trends in pharmacological sciences 15 (7): 239-244 jul 1994
3. Hughes P, Dragunow M: Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene-expression within the nervous-system, *Pharmacological Reviews* 47 (1): 133-178 mar 1995
4. Herdegen T, Leah JD: Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins *Brain research Reviews* 28 (3): 370-490 dec 1998
5. Wagner EF: Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development *Annals of the Rheumatic Diseases* 61: 40-42 suppl. 2 nov 2002
6. Santalucia T, Christmann M, Yacoub MH, et al.: Hypertrophic agonists induce the binding of c-Fos to an AP-1 site in cardiac myocytes: implications for the expression of GLUT1 *Cardiovascular Research* 59 (3): 639-648 sep 1 2003
7. Saito T, Fukuzawa J, Osaki J, et al.: Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35 (9): 1153-1160 sep 2003
8. Cho K, Crivello SD, VanHook TG, et al.: CD14-and toll-like receptor 4-dependent regulation of c-Fos, c-Jun and c-Jun phosphorylation in the adrenal gland after burn injury *Pathobiology* 71 (6): 302-307 2004
9. Rubino T, Forlani G, Vigano D, et al.: Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic Delta(9)-tetrahydrocannabinol treatment, *Molecular and Cellular Neuroscience* 25 (3): 355-362 mar 2004
10. Ray N, Kuwahara M, Takada Y, et al.: C-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin *International Immunology* 18 (5): 671-677 may 2006
11. Fleischmann A, Hvalby O, Jensen V, et al.: Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-fos in the CNS, *Journal of Neuroscience* 23 (27): 9116-9122 oct 8 2003
12. Kubovcakova L, Tybitanclova K, Sabban EL, et al.: Catecholamine synthesizing enzymes and their modulation by immobilization stress in knockout mice, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018: 458-465 2004

3. MÍSTO

FUNKČNĚ GENOMICKÁ ANALÝZA DEFINOVANÉHO ÚSEKU CHROMOZOMU 4 SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍHO KMENE POTKANA U DVOU NOVÝCH KONGENNÍCH KMENŮ

Autoři: Marie Morysová, 4.r., M. Janků, L. Šedová, D. Křenová, F. Liška, P. Hamet, V. Křen, O. Šeda

Školitel: odb. as. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D., Ústav klinické biochemie



OBR. 1. PRŮBĚH GLYKÉMIE V RÁMCI ORÁLNÍHO GLUKÓZOVÉHO TOLERANČNÍHO TESTU. Chybové křivky odpovídají standardní odchylce průměru. Statistická významnost je znázorněna pro faktor KMEN v analýze rozptylu následovně: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

ÚVOD

Metabolický syndrom je multifaktoriálně podmíněné onemocnění, zahrnující několik klinických symptomů (dyslipidémie, hyperinzulinémie, inzulinová rezistence, obezita a hypertenze), z nichž každý představuje komplexní znak, na jehož vzniku se tedy podílí jak komponenta genetická, tak vlivy prostředí. Zkoumání zodpovědné genetické složky u člověka naráží na několik obtížně řešitelných problémů (velká genetická heterogenita obecné populace, krátká generační doba, nízký počet potomků atd.), proto se ve výzkumu genetiky komplexních znaků s výhodou využívá geneticky definovaných zvířecích modelů. K nejčastěji používaným modelům patří kmeny hlodavců, jejichž genomová sekvence je sekvencí DNA člověka a primátů z ostatních savčích modelů evolučně nejbližší. Naše práce spočívala v posouzení vlivu cílené kombinace genomů dvou inbredních modelů metabolického syndromu, konkrétně vnesení definovaného úseku chromozomu 4 pocházejícího od spontánně hypertenzního kmene potkana na vybrané parametry metabolického syndromu u dvou nových kongenních kmenů.

METODY

Experimentální kmeny. Spontánně hypertenzní kmen potkana (SHR/OlaIpcv) se řadí k nejvyužívanějším modelům esenciální hypertenze a též inzulinové rezistence.

Polydaktylní kmen potkana (PD/Cub) vykazující syndrom polydaktylie – luxace sloužil původně ke studiím vývoje dolních končetin a teratogenetickým výzkumům (1). Dále však bylo zjištěno, že kmen vykazuje také zvýšenou hladinu triglyceridů a následně byl ustaven jako model metabolického syndromu (2-4).

V naší studii jsme použili dva nové kongenní kmeny PD.SHR4/D4Rat7 a PD.SHR4/I16-Cd36, u kterých dochází ke kombinaci genetické výbavy dvou výše zmíněných zavedených modelů metabolického syndromu, inbredních kmenů PD/Cub a SHR. Této kombinace bylo dosaženo přenesením definovaného úseku 4.chromozomu SHR původu, na kterém již předchozí studie prokázaly přítomnost QTL (quantitative trait loci) pro metabolický syndrom (5, 6), na genetické pozadí polydaktylního kmene potkana. Derivace kongenních kmenů proběhla zpětným křížením metodou speed congenics, kdy se v generaci zpětných kříženců za pomoci genotypizace markerů v cílové oblasti (marker-assisted metoda), vyberou jedinci, kteří nesou požadovaný úsek a co nejméně zbytku genomu od druhého progenitora.

Genotypizace. Typizací mikrosatelitních markerů polymorfních mezi progenitorovými kmeny pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR) jsme vymezili diferenciální segment chromozomu 4 SHR původu, kdy již předtím jsme potvrdili kongenicitu kmenů celogenomovou typizací vybraných markerů. Testovali jsme DNA izolovanou z potkaních ocasů obou kongenních kmenů (PD.SHR4/D4Rat7, $n = 8$; PD.SHR4/I16-Cd36, $n = 6$) a progenitorových kmenů PD/Cub

a SHR. Bylo použito 54 mikrosatelitních markerů.

Fenotypizace. Fenotypizaci byli podrobeni dospělí samci kmenů PD.SHR4/D4Rat7, PD.SHR4/II6-Cd36 a parentálního kmene PD/Cub (vždy 8 zvířat/ kmen). Projekt pokusu byl schválen odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty 1.LF UK podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Zvířata měla po celou dobu pokusu volný přístup k potravě (standardní dieta) a vodě. Ve věku čtyř měsíců byl u všech jedinců proveden orální glukózový toleranční test, určena inzulinémie, dále byl stanoven lipidemický profil (cholesterol ve 20 lipoproteinových frakcích, triglyceridy ve 20 lipoproteinových frakcích, glycerol, velikost CM, VLDL, LDL a HDL) pomocí speciální metody kapalinové chromatografie (HPLC), hladina volných mastných kyselin a adiponektinu pomocí komerčních kitů. Na závěr byl zjištěn morfometrický profil (tělesná hmotnost, hmotnost srdce, jater, ledvin, nadledvin, epididymálního tuku a retroperitoneálního tuku). Naměřené hodnoty byly porovnávány analýzou rozptylu ANOVA, statistická významnost párových srovnání byla hodnocena post-hoc Tukeyho testem.

Transkriptomický profil. Pomocí exonových čipů Affymetrix GeneChip® Rat Exon 1.0 ST Array, umožňujících hodnotit expresi až 850 000 exonových klastrů, byl stanoven transkriptomický profil zvířat kmene PD.SHR4/D4Rat7 a progenitorového kmene PD. Poolovaná RNA izolovaná z jater čtyřměsíčních samců kmenů PD.SHR4/D4Rat7 byla v sérii několika kroků převedena do značené a fragmentované komplementární cDNA, která byla dále hybridizována k exonovým čipům (PD/ 3 čipy; PD.SHR4/D4Rat7/ 2 čipy). Po vyhodnocení hybridizace, kontrole kvality, normalizaci dat pomocí algoritmu robust multi-array analysis (RMA) byla provedena analýza rozdílů exprese mezi kmeny PD a PD.SHR4/D4Rat7 na úrovni genů (PARTEK Genomics Suite).

VÝSLEDKY

Genotypizace. Testováním 54 mikrosatelitních markerů jsme detailně charakterizovali a vymezili diferenciální segmenty – u kmene PD.SHR4/D4Rat7 mezi markery D4Rat139 - D4Rat222 (cca 16 Mb), u kmene PD.SHR4/II6-Cd36 úsek mezi markery D4Rat248 - D4Rat151 (cca 29 Mb).

Fenotypizace. Výsledky fenotypizace prokázaly signifikantní rozdíly mezi kmeny v několika sledovaných parametrech ($p < 0.05$ pro faktor kmen v analýze rozptylu): lačná glykémie, glykémie – 60 min OGTT, glykémie – 120 min OGTT, gly-



Vítěz pregraduální sekce – teoretické části Pavel Říha přebírá cenu.



Děkan 1. LF UK předává cenu Janu Benešovi, který se umístil na 2. místě v pregraduální sekci – teoretické části.



Marie Morysová se umístila na 3. místě v sekci pregraduální – teoretická část.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ KLINICKÁ VÍTĚZNÉ PRÁCE

VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO SEKCE PREGRADUÁLNÍ – ČÁST KLINICKÁ

1. místo: **Renáta Bartáková a Kateřina Matějů, 4. r.** – II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN

Školitel: MUDr. Roman Škulec

Název práce: „Průzkum používání mírné hypotermie u pacientů po srdeční zástavě na území ČR“

2. místo: **Eva Horová, 6. r.** – III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Školitel: as. MUDr. Martin Prázný, CSc., Ph.D.

Název práce: „Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s Cushingovým syndromem“

3. místo: **Bohumil Majtan, 6. r.** – III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Školitel: as. MUDr. Robert Holaj, CSc.

Název práce: „Texturní příznaky intimomediální tloušťky společné karotidy nemocných s primárním hyperaldosteronismem a esenciální hypertenzí“



1. MÍSTO

PRŮZKUM POUŽÍVÁNÍ MÍRNÉ HYPOTERMIE U PACIENTŮ PO SRDEČNÍ ZÁSTAVĚ NA ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY

Autoři: Renáta Bartáková, 4. r., Kateřina Matějů, 4. r.
Školitel: MUDr. Roman Škulec, II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN Praha



Renáta Bartáková

ÚVOD

Jedním z rizik prodělané srdeční zástavy je nevratné poškození centrálního nervového systému. Indukce mírné hypotermie (MH) u nemocných po srdeční zástavě co nejdříve po obnovení spontánní cirkulace (ROSC) je jediný známý postup, který toto riziko snižuje. Přestože je metoda MH již součástí doporučení pro kardiopulmonální resuscitaci, literární údaje svědčí o tom, že je používána nedostatečně. V západní Evropě a USA ji aplikuje pouze 13–28% jednotek intenzivní péče. Jaký je stav používání této metody v České republice není známo.

CÍL

Zjistit, jak často a jakým způsobem je terapeutická MH u nemocných po srdeční zástavě používána v České republice.



Kateřina Matějů

METODA

Na základě analýzy seznamu nemocnic a veřejných internetových zdrojů jsme sestavili seznam všech jednotek intenzivní péče v České republice. Tyto jsme obeslali v období od prosince 2006 do března 2007 strukturovaným dotazníkem sestávajícím z 23 otázek. Získané odpovědi jsme zpracovali základní statistickou analýzou.

VÝSLEDKY

Obeslali jsme 594 jednotek intenzivní péče, response byla 31%. Pacienty po srdeční zástavě pravidelně ošetřuje 63,4% všech respondentů (116 pracovišť). Z nich použilo metodu MH u nemocných po srdeční zástavě alespoň jednou 57 pracovišť (49,1% ze všech respondentů, kteří pečují o nemocné po srdeční zástavě). Nejčastějším důvodem nepoužívání metody byl nedostatek informací o metodě a fakt, že metoda není zpracována českými doporučeními. Náplní ústního sdělení budou i další podrobné procedurální údaje o používání metody.

ZÁVĚR

Z analyzovaného souboru respondentů vyplývá, že metodu terapeutické mírné hypotermie po srdeční zástavě používá v České republice pouze 49,1% jednotek intenzivní péče pečujících o nemocné po srdeční zástavě. K dalšímu rozšíření metody by pravděpodobně přispěla větší informovanost odborné veřejnosti a implementace této terapeutické metody do doporučení o péči o nemocné po srdeční zástavě.

2. MÍSTO

MIKROVASKULÁRNÍ REAKTIVITA U PACIENTŮ S CUSHINGOVÝM SYNDROMEM

Autoři: Eva Horová ¹, Martin Prázný ¹, Jana Ježková ¹, Viktória Lazárová ¹, Václav Hána ¹, Jan Kvasnička ², Ladislav Pecen ³, Josef Marek ¹, Jan Škrha ¹, Michal Kršek ¹

¹III. interní klinika 1. LF UK, ²I. interní klinika 1. LF UK, ³Ústav informatiky Akademie věd ČR



Eva Horová

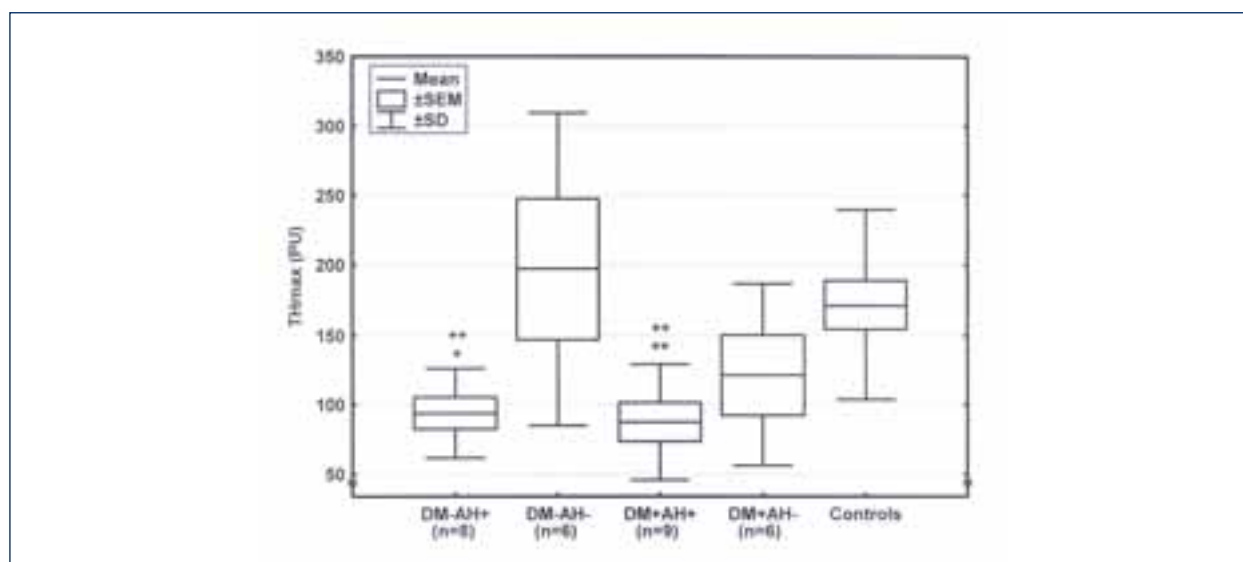
Cushingův syndrom je vzácné endokrinní onemocnění spojené s endogenní nadprodukcí kortizolu. Mezi nejzávažnější komplikace hyperkortisolismu patří arteriální hypertenze, diabetes mellitus, ateroskleróza a zvýšené riziko vaskulárních komplikací. Cushingův syndrom se vyskytuje ve dvou formách. U centrální formy je přítomen adenom hypofýzy s nadprodukcí ACTH a u periferní formy adenom nadledvin s nadprodukcí kortizolu. Cílem studie bylo vyšetření mikrovaskulární reaktivity s použitím metody laser doppleru u pacientů s Cushingovým syndromem s přihlédnutím k přítomnosti diabetu a arteriální hypertenze. Výsledky byly následně porovnány s kontrolní skupinou.

SOUBOR PACIENTŮ A POUŽITÉ METODY

Do studie bylo zařazeno celkem 29 pacientů s aktivním Cushingovým syndromem (8 mužů a 21 žen ve věkovém rozmezí 21 – 60 let). Důvodem hyperkortisolismu byl u 22 pacientů adenom hypofýzy, u 6 pacientů adenom nadledvin a u 1 pacienta ektopická produkce ACTH. 15 pacientů (52%) z této skupiny mělo diabetes mellitus a u 17 pacientů (59%) byla přítomna arteriální hypertenze. Jako kontrolní skupina bylo do studie zařazeno 16 zdravých osob (4 muži a 12 žen ve věkovém rozmezí 29 – 62 let).

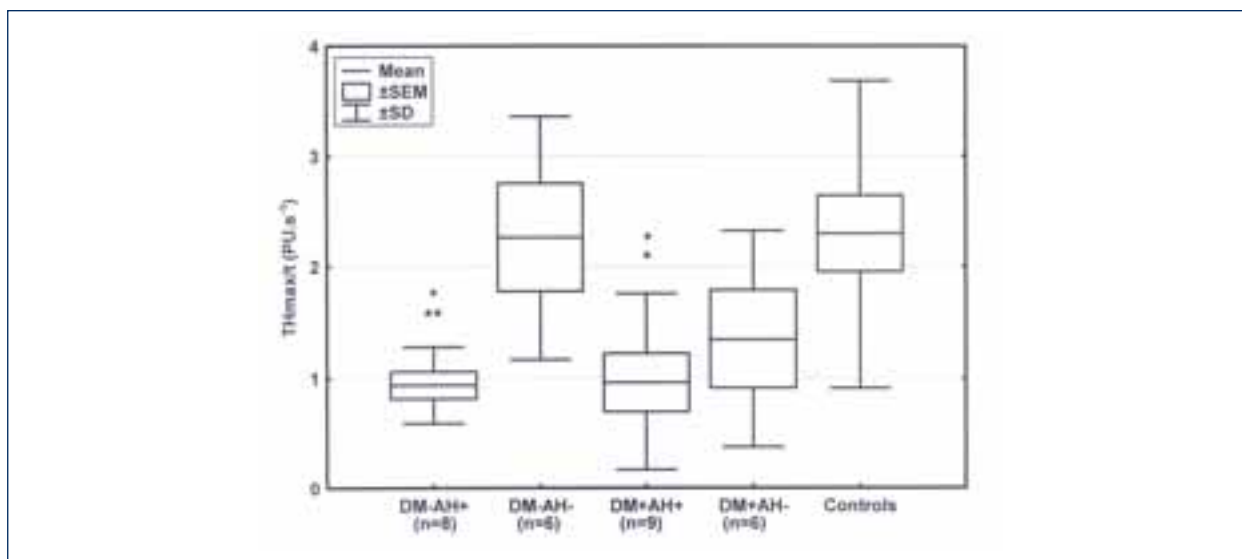
K měření kožní mikrovaskulární reaktivity byla použita metoda laser-doppler. Je to citlivá moderní metoda k hodnocení funkce malých cév, která umožňuje zjištění a hodnocení časných patologických změn v mikrocirkulaci. Mikrovaskulární reaktivita byla měřena přístrojem PeriFlux PF 4001 Master a PeriTemp 4005 Heater (Perimed, Švédsko). Hodnoty jsou uvedeny v perfuzních jednotkách (PU), které jsou arbitrární a nejsou vztaženy k objemu měřené tkáně. Perfuze je pak násobek rychlosti krvinek a jejich množství. Kožní mikrovaskulární reaktivita byla měřena neinvazivně, pomocí sond na ventrální straně předloktí a na třetím prstu nedominantní horní končetiny. Hloubka měření byla cca 1,5 mm.

Klidové hodnoty perfuze bez stimulace neposkytují dostatečnou výpovědní hodnotu, proto byly provedeny stimulační testy. Test s třiminutovou ischemií při okluzi arteria brachialis pomocí manžety tonometru insuflované na suprasystolicovou hodnotu tlaku (post-okluzivní reaktivní hyperémie – PORH) a test s lokálním zahřátím kůže na 44 °C termostatickou



GRAF 1. POROVNÁNÍ MAXIMÁLNÍ PERFÚZE PŘI TERMÁLNÍ HYPERÉMII (THMAX) U PACIENTŮ S CUSHINGOVÝM SYNDROMEM S A BEZ PŘÍTOMNOSTI DIABETES MELLITUS (DM+, DM-), S A BEZ PŘÍTOMNOSTI ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE (AH+, AH-) A U KONTROL

Statistická významnost rozdílu mezi DM-AH+ nebo DM+AH+ a kontrolami (+p<0,01, ++p<0,005), a DM-AH+ nebo DM+AH+ a DM-AH- (*p<0,03, **p<0,01)



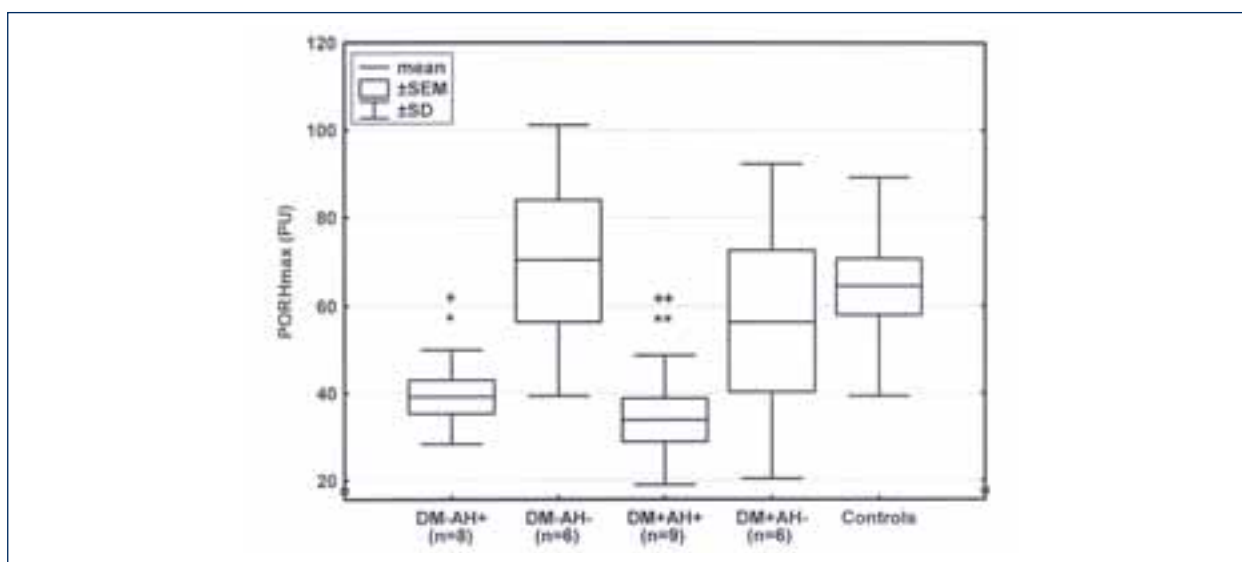
GRAF 2. POROVNÁNÍ RYCHLOSTI VZESTUPU PERFÚZE PŘI TERMÁLNÍ HYPERÉMII (THMAX/T) U PACIENTŮ S CUSHINGOVÝM SYNDROMEM S A BEZ PŘÍTOMNOSTI DIABETES MELLITUS (DM+, DM-), S A BEZ PŘÍTOMNOSTI ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE (AH+, AH-) A KONTROL

Statistická významnost rozdílů mezi DM-AH+ nebo DM+AH+ a kontrolami (+p<0,01, ++p<0,005), a DM-AH+ nebo DM+AH+ a DM-AH- (*p<0,03, **p<0,01)

sondou (termální hyperémie – TH). Při těchto stimulačních testech byla měřena maximální perfúze (PORHmax a THmax) a rychlost vzestupu perfúze (PORHmax/t a THmax/t).

VÝSLEDKY

Pacienti s diabetes mellitus a arteriální hypertenzí měli výrazně nižší maximální perfúzi při PORH než pacienti normotenzní bez diabetu a také než kontrolní skupina ($33,8 \pm 14,9$ vs. $70,2 \pm 30,9$ PU, $p<0,01$ a $64,2 \pm 25,0$ PU, $p<0,005$) a podobně byly nižší hodnoty maximální perfúze při TH ($87,4 \pm 41,7$ vs. $197,2 \pm 112,2$ PU, $p<0,01$ a $171,6 \pm 68,1$ PU, $p<0,005$). U pacientů s diabetem a hypertenzí byly sníženy i hodnoty rychlosti vzestupu perfúze při PORH a TH ve srovnání s pacienty bez těchto komplikací ($3,0 \pm 1,8$ vs. $6,8 \pm 3,4$ PU/s, $p<0,02$ a $1,0 \pm 0,8$ vs. $2,3 \pm 1,1$ PU/s, $p<0,03$). Mezi pacienty bez přidružených komplikací (bez diabetu a hypertenze) a kontrolní skupinou nebyl zjištěn v mikrovaskulární reaktivitě statisticky významný rozdíl. Tyto výsledky jsou znázorněny na grafu 1, 2 a 3.



GRAF 3. POROVNÁNÍ MAXIMÁLNÍ PERFÚZE PŘI POST-OKLUZIVNÍ REAKTIVNÍ HYPERÉMII (PORHMAX) U PACIENTŮ S CUSHINGOVÝM SYNDROMEM S A BEZ PŘÍTOMNOSTI DIABETES MELLITUS (DM+, DM-), S A BEZ PŘÍTOMNOSTI ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE (AH+, AH-) A KONTROL

Statistická významnost rozdílů mezi DM-AH+ nebo DM+AH+ a kontrolami (+p<0,01, ++p<0,005), a DM-AH+ nebo DM+AH+ a DM-AH- (*p<0,03, **p<0,01)

ZÁVĚR

Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s Cushingovým syndromem může být ovlivněna mnoha faktory. Nejvíce ji ovlivňuje přítomnost sekundární arteriální hypertenze. Pacienti s kombinací arteriální hypertenze a diabetes mellitus měli nejvíce vyjádřenou poruchu mikrovaskulární reaktivity. Není jasné, zda porucha mikrocirkulace souvisí přímo i s makrovaskulárními komplikacemi, ale pokud by tomu tak bylo, intenzivnější léčba diabetu a arteriální hypertenze by mohla snížit výskyt cévních komplikací a kardiovaskulárního rizika u pacientů s Cushingovým syndromem.

Podpořeno výzkumným záměrem MSM0021620807 Ministerstva školství ČR.

LITERATURA

1. ETXABE J, VAZQUEZ J: Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf)* **40**: 479-484, 1994.
2. KHAN F, ELHADD TA, GREENE SA, BELCH JJF: Impaired skin microvascular function in children, adolescents, and young adults with type I diabetes. *Diabetes Care* **23**: 215-220, 2000.
3. KRŠEK M, ROSICKÁ M, NEDVÍDKOVÁ J, KVASNIČKOVÁ H, HÁNA V, MAREK J, HALUZÍK M, LAI EW, PACÁK K: Increased lipolysis of subcutaneous abdominal adipose tissue and altered noradrenergic activity in patients with Cushing's syndrome: An in-vivo microdialysis study. *Physiological Research* **55**: 421-428, 2006.
4. SACERDOTE A, WEISS K, TRAN T, NOOR BR, MCFARLANE SI: Hypertension in patients with Cushing's disease: Pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Hypertens Rep* **7**: 212-218, 2005.
5. ŠKRHA J: Pathogenesis of angiopathy in diabetes. *Acta Diabetol* **40**, 2003.
6. ŠKRHA J, PRÁZNÝ M, HAAS T, KVASNIČKA J, KALVODOVÁ B: Comparison of laser-Doppler flowmetry with biochemical indicators of endothelial dysfunction related to early microangiopathy in Type 1 diabetic patients. *Journal of Diabetes and its Complications* **15**: 234-240, 2001.
7. ŠTULC T, KASALOVÁ Z, PRÁZNÝ M, VRABLÍK M, ŠKRHA J, ČEŠKA R: Microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia: effect of lipid lowering treatment. *Physiol Res* **52**: 439-445, 2003.
8. YVONNE-TEE GB, GHULAM RASOOL AH, HALIM AS, BDUL RAHMAN AR: Noninvasive assessment of cutaneous vascular function in vivo using capillaroscopy, plethysmography and laser-Doppler instruments: Its strengths and weaknesses. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **34**: 457-473, 2006.



3. MÍSTO

TEXTURNÍ PŘÍZNAKY INTIMOMEDIÁLNÍ TLOUŠTKY SPOLEČNÉ KAROTIDY NEMOCNÝCH S PRIMÁRNÍM HYPERALDOSTERONISMEM A ESENCIÁLNÍ HYPERTENZÍ

Autoři: Bohumil Majtan, Daniel Smutek, Jaromír Běláček, Zelinka Tomáš, Petrák Ondřej, Štrauch Branislav, Widimský Jiří Jr., Robert Holaj – III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN



Bohumil Majtan

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

ÚVOD

Primární hyperaldosteronismus (PHA) je jednou z forem endokrinně podmíněné hypertenze charakterizovanou vysokým krevním tlakem, hypokalémií, suprimovanou reninovou aktivitou a neadekvátní produkcí aldosteronu. Prevalence PHA mezi nemocnými s arteriální hypertenzí je pravděpodobně vyšší, než bylo dříve akceptované 1% (1-3). Tohoto zvýšení frekvence záchytu mohlo být dosaženo přesnější identifikací nemocných v důsledku široce využívaného testu poměru aldosteronu ku reninu (4). Třebaže PHA je považován za kurabilní onemocnění za předpokladu odstranění adenomu nadledviny nebo podávání antagonistů receptoru pro aldosteron, v mnoha případech hypertenze může přetrvávat i po залéčení (5).

Primární hyperaldosteronismus byl dlouho považován za relativně benigní formu hypertenze spojenou s nízkým výskytem orgánových komplikací (6). To bylo všeobecně připisováno supresi osy renin angiotenzin, ke které dochází v důsledku zvýšení cirkulujícího volumu navozeného aldosteronem (7). Nicméně nedávno publikované experimentální studie předpokládají, že dlouhodobá expozice zvýšeným hladinám aldosteronu může vést ke kardiovaskulárnímu (8) a ledvinnému (9,10) strukturálnímu poškození, a to nezávisle na výšce krevního tlaku. U nemocných s PHA se projeví ukazatele kardiovaskulárního poškození, jako je endoteliální dysfunkce, strukturální změny v rezistentních cévách, hypertrofie levé komory srdeční a porucha její diastolické funkce (11). Nepřímý důkaz o poškození tkání navozeném aldosteronem byl získán z klinických studií probíhajících u nemocných se srdečním selháním, kteří byli léčeni antagonisty receptorů pro aldosteron s významným snížením podílu mortality (12,13).

Experimentální práce prokázaly, že aldosteron je schopen navodit hypertrofii a hyperplázii cévní svaloviny (14). Aldosteron stimuluje růst buněk a remodelování cév, což může vést, jak bylo pozorováno v observačních studiích, ke zvýšení hmotnosti levé komory srdeční (15-17) nebo ke zvýšení poměru média ku průměru cévy u nízkorezistentních tepen ve srovnání s nemocnými s esenciální hypertenzí (18). Nicméně aldosteron také vyvolává hluboké změny v extracelulární matrix, vedoucí k ukládání kolagenu (19) a tím ke zvýšení tuhosti cév (20) a fibróze myokardu (21-23).

VÝCHODISKO

V cévách nemocných s PHA ve srovnání s nemocnými s esenciální hypertenzí (EH) dochází k většímu zmnožení kolagenu vedoucímu k zvýšení cévní tuhosti a možná i nárůstu intimomediální tloušťky. Kvalitativní změny v sonografickém obrazu cévy u těchto nemocných však dosud nebyly publikovány.

CÍL

V naší práci jsme se snažili pomocí analýzy textury sonografického obrazu karotid na základě pěti texturních příznaků vycházejících z Haralickovy analýzy obrazu najít kvalitativní rozdíly mezi nemocnými s PHA a EH.

METODIKA

Intimomediální komplex distálního úseku společné karotidy jsme podrobili digitální analýze u souboru 15 nemocných s PHA a 12 nemocných s EH. Nemocní se nelišili věkem ani výškou systolického resp. diastolického krevního tlaku. Ke zpracování obrazu a výpočtu texturních příznaků byl použit script vytvořený v programu Matlab.

VÝSLEDKY

Charakteristika souboru je uvedena v tabulce 1, Haralickovy texturní příznaky jsou uvedeny v tabulce 2. Za signifikantní jsme považovali rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.

TABULKA 1: POPISNÉ CHARAKTERISTIKY SOUBORU

	PHA (n=15)	EH (n=12)
Věk (roky)	58 ± 8	53 ± 6
Pohlaví (M/Ž)	10/5	8/4
BMI (kg/m ²)	29,7 ± 4,28	30,1 ± 3,42
Systolický TK (mm Hg)	162 ± 8	161 ± 20
Diastolický TK (mm Hg)	95 ± 8	94 ± 13
IMT (mm)	1,01 ± 0,19*	0,92 ± 0,12

*P<0,05

TABULKA 2: HARALICKOVY TEXTURNÍ PŘÍZNAKY

Texturní příznak	PHA		EH	
	medián	rozpětí	medián	rozpětí
Entropie	0,0134789	0,0021259*	0,0131155	0,0012901
Kontrast	0,0003468	0,0003563	0,0002957	0,0002406
Homogenita	0,0015632	0,0001750	0,0015892	0,0001111
Korelace	0,9633058	0,0905678	0,9601596	0,0584975
Uniformita	0,0000010*	0,0000014*	0,0000013	0,0000008

*P<0,05

ZÁVĚR

Formální statistickou analýzou se nám podařilo pomocí několika Haralickových příznaků (uniformita, entropie) prokázat statisticky významné rozdíly mezi nemocnými s PHA a EH.

Na základě sonografického obrazu formální analýzou texturních vzorců diagnózu PHA od EH však doposud bezpečně rozlišit neumíme.

Podpořeno grantem IGA MZČR NR/8155-5.

LITERATURA

- Štrauch, B., Zelinka, T., Hampf, M., Bernhardt, R., Widimský, J.: Prevalence of primary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region. *J Hum Hypertens* 2003; 17: 349-52.
- Plouin PF, Amar L, Chatellier G: COMETE – Conn Study Group. Trends in the prevalence of primary aldosteronism, aldosterone – producing adenomas and surgically correctable aldosterone – dependent hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:774-777.
- Mulatero P, Stowasser M, Lohn KC et al. Increase diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable form, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1045-1050.
- Gordon PD. The challenge of more robust and reproducible methodology in screening for primary aldosteronism. *J Hypertens* 2004;22:251-255.
- Sawka AM, Young WF Jr, Thompson GB et al. Primary aldosteronism: factors associated with normalization of blood pressure after surgery. *Ann Intern Med* 2001;135:258-261.
- Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM. Clinical characteristics of primary aldosteronism from analysis of 145 cases. *Am J Surg* 1964;107:159-172.
- Laragh JH. Vasoconstriction – volume analysis for understanding and treating hypertension: the use of renin and aldosterone profiles. *Am J Med* 1973;55:261-274.
- Rocha R, Funder JW. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* 2002;970:89-100.
- Greene EL, Kren S, Hoestetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 1996;98:1063-1068.
- Hollenberg NK. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney Int* 2004;66:1-9.
- Rossi G, Boscaro M, Ronconi V, Funder JW. Aldosterone as a cardiovascular risk factor. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:104-107.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The effect of spiro lactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999;341:709-717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-1321.
- Oberleithner H, Ludwig T, Riethmuller C, Hillebrand U, Albermann L, Schafer C, et al. Human endothelium: target for aldosterone. *Hypertension* 2004; 43:938-40.
- Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, Pessina AC. Changes in left ventricular anatomy and function

- in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* 1996;27:1039–1045.
16. Shigematsu Y, Hamada M, Okayama H, Hara Y, Hayashi Y, Kodama K et al. Left ventricular hypertrophy precedes other target-organ damage in primary aldosteronism. *Hypertension* 1997;29:723–7.
 17. Matsumura K, Fujii K, Oniki H, Oka M, Iida M. Role of aldosterone in left ventricular hypertrophy in hypertension. *Am J Hypert* 2006; 19:13-18.
 18. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P et al. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension* 1996;28:785–790.
 19. Rizzoni D, Paiardi S, Rodella L, Porteri E, De Ciuceis C, Rezzani R et al. Changes in extracellular matrix in subcutaneous small resistance arteries of patients with primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2638-42.
 20. Štrauch B, Petrák O, Wichterle D, Zelinka T, Holaj R, Widimský J Jr. Increased arterial wall stiffness in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. *Am J Hypert* 2006;19:909-914.
 21. Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Moll Cell Cardiol* 2000; 32:865-79.
 22. Schmidt BM, Schmieder RE. Aldosterone-induced cardiac damage: focus on blood pressure independent effects. *Am J Hypertens* 2003; 16:80-6
 23. Rossi GP, Di Bello V, Ganzaroli C, Sacchetto A, Cesari M, Bertini A et al. Excess aldosterone is associated with alterations of myocardial texture in primary aldosteronism. *Hypertension* 2002; 40:23-7.
 24. Holaj R, Zelinka T, Wichterle D, Petrák O, Štrauch B, Widimský J Jr. Increased intima–media thickness of the common carotid artery in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. *J Hypertens* 2007; 25:1451-7.



Renáta Bartáková a Kateřina Matějů zvítězily v sekci pregraduální – klinické části.



Druhé místo v sekci pregraduální – klinická část obsadila Eva Horová.



Třetí místo v sekci pregraduální – klinická část obsadil Bohumil Majtan.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY VÍTĚZNÉ PRÁCE

VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY

1. místo: **MUDr. Lukáš Lacina** – Anatomický ústav 1. LF UK

Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana, Jr., DrSc.

Název práce: „Vliv buněk nádorového stromatu na fenotyp normálních lidských keratinocytů“

2. místo: **Mgr. Lukáš Stibůrek** – Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.

Název práce: „shRNA – mediated knockdown of human Oxa11 in HEK293 cells“

3. místo: **MUDr. Martin Leníček** – Hepatologická laboratoř ÚKB LD 1. LF UK a VFN

Školitel: doc. MUDr. Libor Vítek, Ph.D.

Název práce: „Jednoduchá a přesná metoda stanovení sérové koncentrace 7α -hydroxy-4-cholesten-3-onu, markeru malabsorpce žlučových kyselin“

1. MÍSTO

VLIV BUNĚK NÁDOROVÉHO STROMATU NA FENOTYP NORMÁLNÍCH LIDSKÝCH KERATINOCYTŮ

Autoři: Lukáš Lacina, Barbora Dvořánková, Zdeněk Čada, Karel Smetana Jr.
Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana Jr., DrSc., Anatomický ústav 1. LF UK



Lukáš Lacina

ÚVOD

Rezidentní kmenové buňky stratifikovaných epitelů jsou v posledních letech intenzivně zkoumány jako populace zodpovědná za udržování morfologických a funkčních vlastností těchto tkání. Nověji je věnována pozornost nádorovým kmenovým buňkám, které hrají analogickou roli v patologických situacích. Je známo, že kmenové buňky se ve stratifikovaných epitelech vyskytují pouze ve vazbě na specifické mikroprostředí. Tyto oblasti jsou běžně označovány jako niche. Mikroenvironmentální faktory definující niche umožňují kmenovým buňkám udržet si nízkou úroveň diferenciaci a zároveň neomezenou možnost proliferace, tedy dvě klíčové vlastnosti kmenových buněk. Předpokládá se, že na tvorbě tohoto specifického mikroprostředí se podílejí jak kmenové buňky, tak i okolní buněčné populace. Interakce mezi epitelem a mezenchymem jsou důležité nejen pro vývoj kůže a sliznic prenatalně, ale uplatňují se i postnatálně v průběhu regenerace. Stejně tak se mezenchym nutně podílí i při rozvoji maligních nádorových onemocnění. Zdá se, že právě tato interakce se může spolupodílet na některých významných vlastnostech nádorů, jako je například jejich agresivita, či rezistence vůči terapii.

CÍL STUDIE

Cílem této studie je sledování vlivu buněk nádorového stromatu izolovaných z bazocelulárního /BCC/ a spinocelulárního /SCC/ karcinomu na fenotypové změny interfolikulárních keratinocytů navozené v průběhu kokultivace.

METODIKA

Fenotyp lidských maligních nádorů (bazocelulárního a spinocelulárního karcinomu) byl porovnáván s fenotypem normálních interfolikulárních keratinocytů kokultivovaných in vitro s různými typy fibroblastů. Jako model nádorového stromatu byly použity fibroblasty izolované z biopsií z bazocelulárního a spinocelulárního karcinomu. Jako kontrolní fibroblastová populace posloužila myší embryonální linie 3T3, dále humánní fetální plicní fibroblasty linie LEP a adultní humánní fibroblasty připravené z dermis zdravých dárců. Imunocytochemicky byla detekována exprese keratinů (K8, K14, K19), tří typů endogenních lektinů tj galektinů (Gal-1, Gal-3 a Gal-7) a vazebných míst pro ně, proliferací markeru Ki-67, nukleolárního proteinu nukleosteminu a membránového epiteliálního antigenu Ber-EP4. Zároveň byl studován i fenotyp a karyotyp fibroblastů izolovaných ze stromatu BCC a SCC. Tumorigenicita těchto stromálních buněk byla testována jejich implantací do podkoží NOD/LtSz-Rag1null myši.

VÝSLEDKY

U sledovaných stromálních buněk nebyla pokusem in vivo, při němž byly tyto buňky implantovány do podkoží NOD/LtSz-Rag1null myši, prokázána jejich tumorigenicita. Stanovený karyotyp prokázal v případě buněk ze stromatu bazocelulárního karcinomu hrubé odchylky od normy (aneuploidie), obdobné vyšetření buněk ze stromatu spinocelulárního karcinomu prokázalo euploidní stav. Zásadní odlišnost od běžných fibroblastů (linie 3T3, LEP a adultní dermální fibroblasty) prokázaly buňky izolované ze stromatu nádorů při kokultivaci s normálními interfolikulárními keratinocyty. Tyto buňky při kokultivaci s normálními keratinocyty in vitro dokázaly vyvolat v epitelích fenotypové změny, následkem kterých získaly zdravé keratinocyty některé rysy kmenových buněk a zároveň některé charakteristiky shodné s nádorem, ze kterého byly stromální buňky izolovány. Kokultivací navozená pozitivita membránového antigenu Ber-EP4 je v dobré shodě s imunohistochemicky prokazovaným fenotypem bazocelulárního karcinomu, obdobně je tomu tak i s detekcí positivity keratinu 19 v některých případech téhož typu karcinomu. Stromálními buňkami SCC indukovaná exprese keratinu 8 je značně neobvyklým nálezem, tento keratin není totiž postnatálně exprimován v lidské nenádorové tkáni. Naopak u některých typů nádorů (SCC) je exprese keratinu-8 považována za marker poukazující na možnost klinicky krajně nepříznivého průběhu onemocnění pacienta. Prokázaná exprese vazebných míst pro Galectin-1 poukazuje na nízkou diferenciaci epiteliálních buněk kultivovaných pod vlivem fibroblastů izolovaných ze stromatu nádorů (BCC a SCC). Obdobně lze hodnotit i navozenou pozitivitu exprese nukleolárního proteinu Nukleosteminu a keratinu 19. Keratin 19 je etablován jako jeden ze znaků epidermálních kmenových buněk. Na rozdíl od dočasné exprese keratinu 19, která navazuje na readhezi buněk in vitro, je pozitivita navozená v kokultuře se stromálními buňkami dlouhodobějšího charakteru. Provedení kokultivace v insertovém systému, při kterém jsou buněčné populace fyzicky odděleny mikroporózní kolagenovou membránou umožňující pouze prostup solubilních látek, ne však prostup buněk samých, testovalo závislost navozených fenotypových změn na přímém kontaktu studovaných buněk. Bylo prokázáno, že v případě kokultivace normálních keratinocytů a stromálních buněk BCC přetrvává v tomto systému pozitivita keratinu 19 a Nukleosteminu, naopak již není prokazatelná exprese Ber-EP4.

V případě, že byly použity v pokusu v insertovém systému buňky ze stromatu SCC, přetrvávají navozené změny (pozitivita keratinu 8, keratinu 19 a Nukleosteminu) i po této fyzické separaci buněk.

K ověření nutnosti synchronní kultivace byly provedeny experimenty, při kterých byl hodnocen fenotyp keratinocytů rostoucích na podpůrných buňkách kontrolní linie v médiu kondicionovaném působky stromálních buněk. V případě, že bylo médium obohaceno o solubilní faktory produkované buňkami stromatu SCC, byla ve sledovaných keratinocytech cytochemicky prokázána pozitivita keratinu 8.

Stromální buňky SCC byly schopny při všech třech výše popsanych způsobech kultivace navodit v keratinocytech, tedy buňkách ektodermového původu, expresi vimentinu -markeru mesenchymových buněk. V některých buňkách bylo možno detekovat kolokalizaci signálu pro keratiny společně se signálem pro vimentin, který vykazoval pozitivitu zejména v cytoplazmě buněčných výběžků. Tento fenomén může být vysvětlen mechanismem epitelu-mesenchymální transformace. Tuto teorii podporuje i cytochemický průkaz transkripčního faktoru SNAIL v jádrech buněk; tento faktor se uplatňuje právě při regulaci tohoto děje.

Zajímavým zjištěním je i závislost některých výše popsanych fenotypových změn na proliferační aktivitě stromálních buněk. Bylo pozorováno, že je-li proliferace stromálních buněk zastavena ošetřením mitomycinem C (průkaz negativitou proliferačního markeru Ki-67), pak již není možno v keratinocytech detekovat pozitivitu Nukleosteminu.

ZÁVĚR

Fenotypové změny indukované u normálních keratinocytů vlivem nádorových stromálních fibroblastů poukazují na možný význam role stromatu v procesu nádorového onemocnění. Původ stromatu může být objasněn třemi mechanismy. Ve shodě s klasickým pohledem se může jednat o lokální fibroblasty, které jsou regulovány vlivem cytokinů a růstových faktorů produkovaných maligně transformovaným epitelem tak, aby plnily funkce nádorového stromatu. Druhou literárně uváděnou teorií je možnost fúze maligně transformovaných epitelálních buněk s lokálními fibroblasty. Takováto buněčná fúze by nutně vedla k výrazným změnám karyotypu. Třetí možností je vznik stromatu přímo z maligně transformovaného epitelu mechanismem epitelu-mesenchymální transformace. Nádorové stroma se může aktivně podílet na tvorbě specifického mikroprostředí nutného k udržení a rozvoji maligního onemocnění. Následně tak může být nádorové stroma spoluzodpovědné za některé biologické procesy, které mohou vést k resistenci tumoru vůči terapeutickým zásahům.



2. MÍSTO

SHRNA-MEDIATED KNOCKDOWN OF HUMAN OXA1L IN HEK293 CELLS

Authors: Lukáš Stibůrek, Daniela Fornůstková, Martina Pejznochová, Laszlo Wenchich, Hana Hansíková and Jiří Zeman

Supervisor: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Department of Pediatrics and Center of Applied Genomics, First Faculty of Medicine Charles University of Prague and General Teaching Hospital



Lukáš Stibůrek

The Oxa1 translocase was identified in fungi as a crucial component of the inner mitochondrial membrane export machinery that mediates the insertion of both mitochondrially and nuclear encoded proteins into the inner membrane from the mitochondrial matrix. The predicted human homologue, Oxa1l, was originally identified by partial functional complementation of the respiratory growth defect of yeast *oxa1* mutant. Here we demonstrate that both the endogenous human Oxa1l, with an apparent molecular mass of 42 kDa, and the Oxa1l-FLAG chimeric protein localize exclusively to mitochondria in HEK293 cells. Furthermore, human Oxa1l was found to be resistant to alkaline carbonate extraction, and using two-dimensional blue native/denaturing PAGE, the majority of the protein was identified as part of a 600-700 kDa complex in the mitochondria of HEK293 cells. The stable shRNA-mediated knockdown of Oxa1l in HEK293 cells resulted in markedly decreased steady-state levels and ATP hydrolytic activity of the F_1F_0 -ATP synthase and moderately reduced levels and activity of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). However, no significant accumulation of corresponding subcomplexes could be detected on blue native immunoblots. Surprisingly, the achieved depletion of Oxa1l protein did not adversely affect the assembly or activity of cytochrome c oxidase or the cytochrome bc_1 complex. Taken together, our results indicate that human Oxa1l represents a mitochondrial integral membrane protein required for the biogenesis of F_1F_0 -ATP synthase and NADH: ubiquinone oxidoreductase complexes.

GAUK 87607, GAUK 1/2006/R

3. MÍSTO

JEDNODUCHÁ A PŘESNÁ METODA STANOVENÍ SÉROVÉ KONCENTRACE 7 α -HYDROXY-4-CHOLESTENU-3-ONU, MARKERU MALABSORPCE ŽLUČOVÝCH KYSELIN



Martin Leníček

Autoři: M. Leníček, J. Zelenka, M. Bortlík, M. Lukáš, L. Vítek
Školitel: doc. MUDr. Libor Vítek, PhD., MBA. Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

ÚVOD

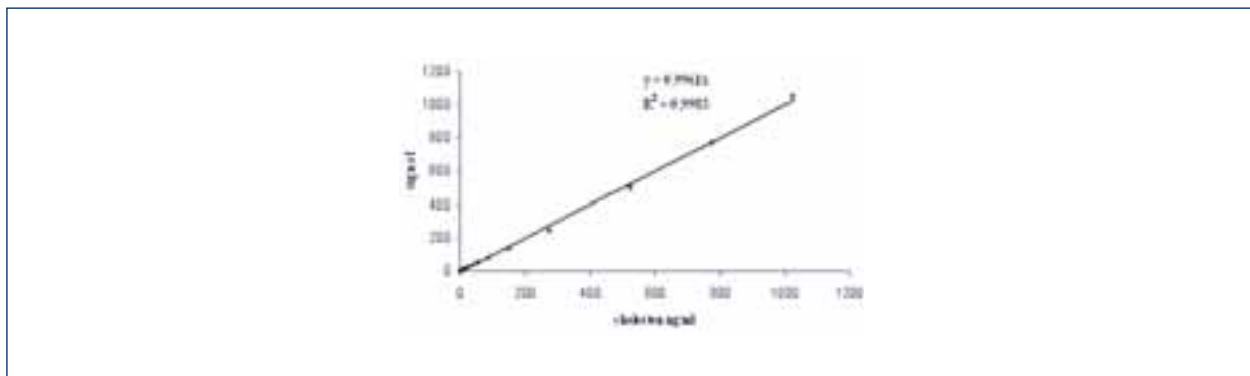
Stanovení malabsorpce žlučových kyselin (BAM) představuje, zejména v gastroenterologii, důležitý diagnostický nástroj. Překvapivě je jen velmi málo metod, které lze k určení BAM použít. Takzvaný "zlatý standard" ⁷⁵SeHCAT není v celé řadě zemí povolen (včetně ČR) a stanovení množství žlučových kyselin (BA) ve stolici za 24 hodin se prakticky neprovádí. BAM lze určit pomocí sérových koncentrací 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-onu (cholestenu), meziprojektu syntézy BA (1-4). Stanovení tohoto analytu vyžaduje komplikovanou extrakci na pevnou fázi při 64°C, což brání rutinnímu použití (4).

METODIKA

Tento limitující krok jsme obešli navržením nové metody extrakce. Cholesten je extrahován chloroform:methanolem (2:1 v/v) a v toluenu nanesen na křemíkovou předkolonku za pokojové teploty. Po promytí hexanem a hexan-isopropanolem (99,6:0,4 v/v) je eluován 1ml isopropanolu. Po odpaření a rozpuštění v acetonitrilu je vzorek separován pomocí HPLC (kolona C18, 250x4 mm, velikost částic 4 um; mobilní fáze acetonitril:voda 95:5 v/v; detekce 241nm, referenční vlnová délka 360 nm). 7 β -hydroxy-4-cholesten-3-on slouží jako vnitřní standard.

VÝSLEDKY

Popisovaná metoda je přesná, citlivá a lineární v širokém rozmezí (2 až 1000 ng/ml) (Obr 1, Tab 1). Na souboru čítajícím asi 400 jedinců byl stanoven medián sérové koncentrace cholestenu na 12 ng/ml u zdravých jedinců, zatímco u pacientů s Crohnovou chorobou po rozsáhlé resekci terminálního ilea byly koncentrace až 450 ng/ml (medián 112 ng/ml) (5).



OBR 1. LINEÁRNÍ REGRESE

TAB 1 OPAKOVATELNOST (15 MĚŘENÍ JEDNOHO VZORKU)

Koncentrace	SD	CV (%)
17.1 ng/ml	1,1	6,6
136.0 ng/ml	4,3	3,2

ZÁVĚR

Nově popisovaná metoda nabízí spolehlivý nástroj k určení BAM, který může být jednoduše uveden do rutinního laboratorního provozu.

**LITERATURA**

1. Gerd H. Sauter, Wolfgang Munzing, Christoph Von Ritter, and Gustav Paumgartner. Bile Acid Malabsorption as a Cause of Chronic Diarrhea Diagnostic Value of 7[alpha]-Hydroxy-4-Cholesten-3-One in Serum. *Digestive Diseases and Sciences* 44 (1):14-19, 1999.
2. M. Axelson, A. Aly, and J. Sjovall. Levels of 7[alpha]-hydroxy-4-cholesten-3-one in plasma reflect rates of bile acid synthesis in man. *FEBS Letters* 239 (2):324-328, 1988.
3. S. Eusufzai, M. Axelson, B. Angelin, and K. Einarsson. Serum 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one concentrations in the evaluation of bile acid malabsorption in patients with diarrhoea: correlation to SeHCAT test. *Gut* 34 (5):698-701, 1993.
4. C. Galman, I. Arvidsson, B. Angelin, and M. Rudling. Monitoring hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *J Lipid Res* 44 (4):859-866, 2003.
5. M. Leníček, M. Lukáš, L. Dudková, S. Adamec, L. Vitek. Vztah malabsorpce žlučových kyselin a rizika cholelitiázy u pacientů s Crohnovou nemocí. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 60 (2):73-76, 2006.



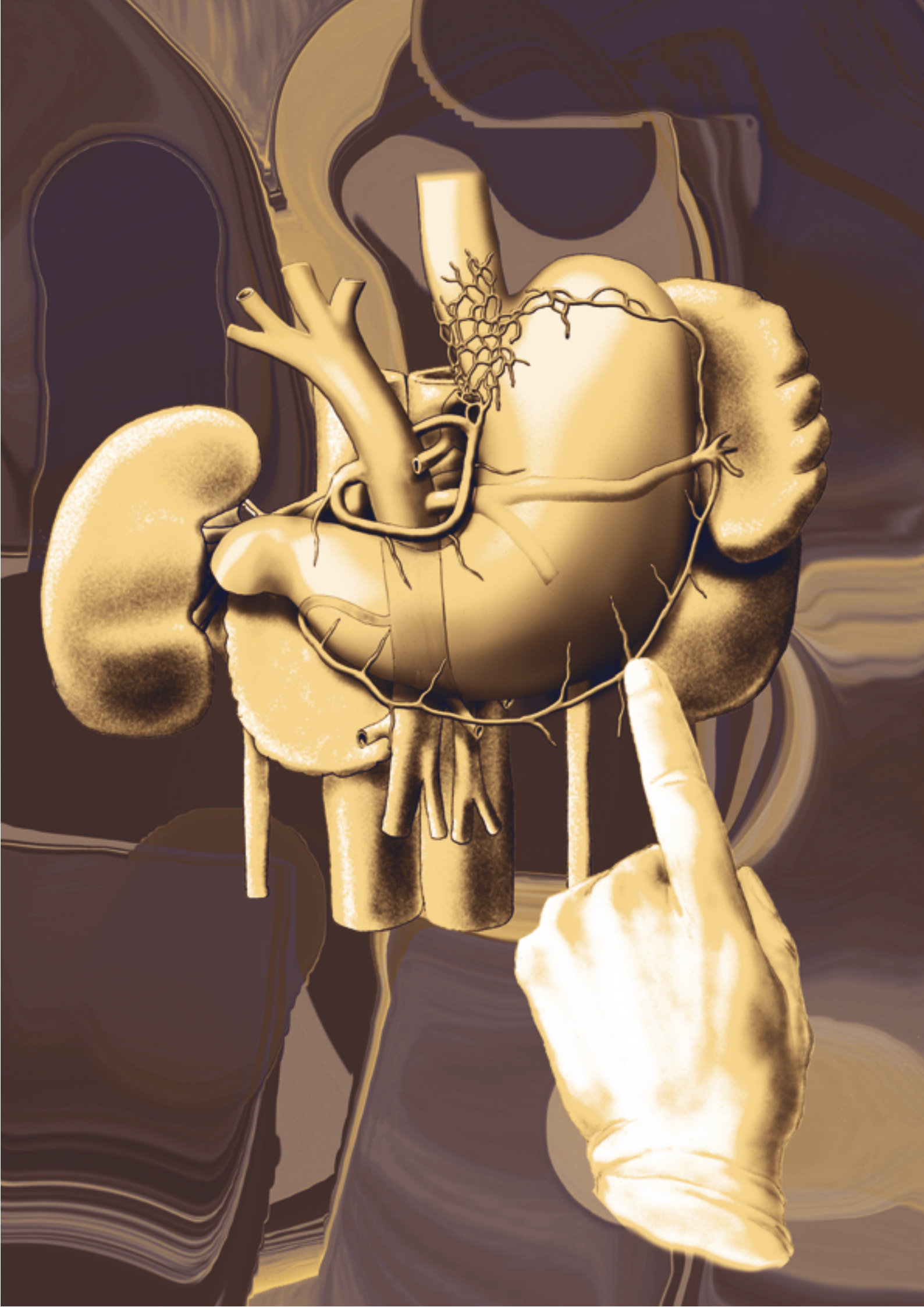
První místo v sekci postgraduální – přednášky obsadil MUDr. Lukáš Lacina.



Mgr. Lukáš Stibůrek přebírá cenu za 2. místo, které obsadil v sekci postgraduální – přednášky.



MUDr. Martin Leníček se umístil na 3. místě v sekci postgraduální – přednášky.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ POSTERY VÍTĚZNÉ PRÁCE

VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY

1. místo: **MUDr. Jarmila Klieščíková** – Odd. tropické medicíny a laboratoř tropických parazitóz 1. LF UK
Školitel: RNDr. Eva Nohýnková, Ph.D.
Název práce: „Využití RNA interference při studiu úlohy glykogenfosforylázy během encystace volně žijících améb rodu *Acanthamoeba*“

2. místo: **MUDr. Ing. Radek Jirman** – Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN
Školitel: **prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc.**
Název práce: „Feem analysis of temporomandibular joint“

3. místo: **MUDr. Petra Lišková** – Laboratoř biologie a patologie oka 1. LF UK a VFN
Školitel: prof. MUDr. Martin Filipec, CSc.
Název práce: „Identifikace nových mutací v genu ZEB1 u českých a britských pacientů se zadní polymorfní dystrofií rohovky“

1. MÍSTO

**ENCYSTATION OF THE FREE-LIVING AMOEBAE
ACANTHAMOEBA SPP.: GLYCOGEN PHOSPHORYLASE
IN ACANTHAMOEBA SPP.: DETERMINING THE ROLE
OF THE ENZYME DURING THE ENCYSTMENT USING RNAI**

Authors: Jarmila Klieščíková¹, Jacob Lorenzo-Morales², Eva Nohýnková¹

Supervisor: RNDr. Eva Nohýnková, Ph.D.



Jarmila Klieščíková

¹Department of tropical medicine, First Faculty of Medicine,
Charles University in Prague, Prague, Czech republic

²University institute of tropical diseases and public health of the Canary Islands, University
of La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

INTRODUCTION

Acanthamoeba spp. belongs to the group of the free-living amphizoic amoebae. It is causative agent of rarely occurring fatal chronic disease affecting immunocompromised individuals called granulomatous amoebic encephalitis and chronic infection of the cornea affecting immunocompetent contact lenses wearers called amoebic keratitis. The number of the cases of both of the diseases appear to be increasing in the past decades worldwide, but the treatment is still not always successful (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). One of the reasons for high resistance against available therapy is existence of specific stages in the life cycle of the acanthamoebae called cysts. Under favourable environmental conditions trophozoites of acanthamoebae feed on bacteria in the soil and water. Once the conditions of the environment are not favourable for the growth, the trophozoites differentiate into dormant cysts, which were shown to be viable and still possessing pathogenic characteristics even after 15 years of storage (Mazur, T., et al. 1995) Therefore the understanding of encystation is crucial for future development of anti-amoebic therapy leading to decreased resistance of acanthamoebae.

Cysts of acanthamoebae are double walled. Exocyst (outer wall) consists mainly of proteins and possesses minor content of cellulose. Endocyst (inner wall) consists mainly of cellulose. Cellulose is a most abundant polysaccharide in the nature consisting of glucose residues connected by beta-1,4-linkages. We were interested in the source of the UDP-glucose for cellulose synthesis during encystation of acanthamoebae. As the glycogen amount was already shown to be decreasing during differentiation of amoebae and its degradation was suggested to be the main source of glucose for cellulose synthesis (Potter et al. 1971; Stewart and Weisman, 1974) we have decided to silence the expression of glycogen phosphorylase (GP), as a main enzyme of glycogen degradation, by RNAi. To exclude the possibility of glucose uptake from the environment, encystation media with and without addition of glucose were used.

MATERIALS AND METHODS

Different strains of acanthamoebae (*A. castellanii* Neff, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*) were grown in PYG media. For induction of encystation growing culture of trophozoites was overlaid with encystation medium (Neff, 1969).

In order to detect glycogen phosphorylase sequence in different strains of acanthamoebae, PCR with specific primers designed with Primer3 programme based on sequence published in Genebank under accession number EC109277 EMBL database, was carried out.

Expression of glycogen phosphorylase during encystation was detected by Northern blot as described by Sambrook et al., 1989.

siRNAs targeting the glycogen phosphorylase of *Acanthamoeba castellanii* Neff were designed using the BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and synthesized by Invitrogen Ltd. (Carlsbad, CA). siRNAs were delivered directly to the encystation media by siPORT NeoFx Agent (Ambion, Madrid, Spain) in a final concentration 20 µg/ml. Controls with scrambled siRNA and transfecting agent alone were also used.

Cellulose synthesis during encystation was detected by Calcofluor (Sigma) staining. Nuclei were stained with Vectashield PI (Vector, USA).

Sensitivity of pseudocysts formed in the presence of GP siRNAs, and mature cysts was detected by 0.5% SDS treatment as described before (Dudley et al. 2005). Viability was tested by inoculation of pseudocysts and mature cysts on non-nutrient agar covered with inactivated *Enterobacter aerogenes* as a food source.

RESULTS

After PCR amplification with the glycogen phosphorylase primer pair, a 516-bp DNA fragment was obtained for three isolates. After blast analysis, the obtained sequences showed 98 (*A. polyphaga*) and 99 % (*A. castellanii* Neff ATCC 30010), respectively, homology with the available *A. castellanii* Neff glycogen phosphorylase sequence (EMBL database accession no.: EC109277).

Northern blot detected expression of GP in aliquots from 8th, 12th and 24th hour after induction of encystation, while no expression was detected in trophozoites. No expression of GP was detected in trophozoites encysting in the media with siRNAs. Profiles of GP expression have shown no differences between media with or without addition of glucose. Amoebae in the siRNA treated and control cultures remained as trophozoites until 12 hrs after induction of encystation, when most of them detached from the flask and rounded up. First mature cysts with double-wall architecture appeared in control cultures after 24 hrs (Fig. 1a). Their number was constantly increasing, and reached 83% 96 hrs after induction of encystation. siRNA treated amoebae on the other hand remained in rounded form with only one layer of the wall present (Fig. 2a) until 96 hrs, when 4.1% formed both layers. However the number of mature cysts was significantly lower in the siRNA treated cultures compared to the control cultures and is in accordance with known lasting of silencing phenomena (maximum 96 hrs).

When considering the cellulose synthesis, vesicles, most probably containing active cellulose synthases appear in the cytoplasm of trophozoites 6 hrs after induction of encystation in both siRNA treated and control cultures. 12 hrs after induction of encystation patchy cellulose remnants appear on the cell surface of trophozoites in both cultures. 24 hrs after induction of encystation confluent outer layer is formed in both cultures. However, in contrast to siRNA treated cultures, first mature cysts (Fig.1b) with both layers of the cyst wall appear after 24 hrs in the control cultures also. The number of mature cysts in control cultures is continually increasing and reaching 83% 96 hrs after induction. siRNA treated cultures were shown to develop single-layered pseudocysts within monitored interval (Fig. 2b). Even if the mature cysts in siRNA treated cultures were detected 96 hrs after induction of encystment, the number was significantly lower (4.1%) compared to the control cultures (83%).

Resistance of single layered pseudocysts formed in the presence of siRNA and mature cysts from control cultures was tested by 0.5% SDS. In contrast to mature cysts, single-wall pseudocysts were shown not to be resistant to this treatment and most of the cells underwent lysis within 5 min of exposure.

Both cultures (siRNA treated and control) were tested for viability by inoculation of aliquot onto non-nutrient agar covered by *Enterobacter aerogenes* as a food source. Both cultures excysted within 24 hrs with significantly higher number of trophozoites in the siRNA treated cultures, raising the possibility of faster excystment.

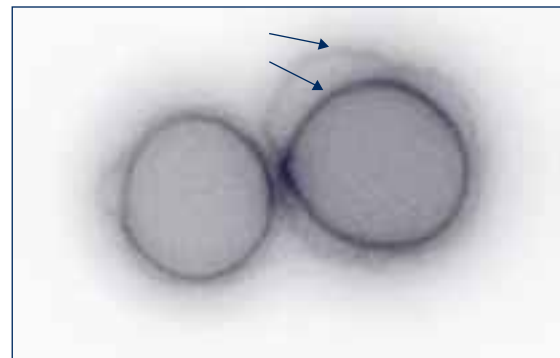
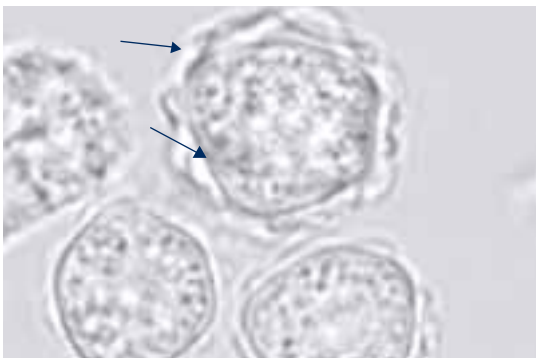


FIG. 1A – NATIVE PICTURE OF MATURE CYSTS POSSESSING BOTH LAYERS OF THE CYST WALL (ARROWS)

FIG. 1B – CELLULOSE STAINED BY CALCOFLUOR WHITE. DOUBLE-WALLED ARCHITECTURE OF MATURE CYSTS (ARROWS)

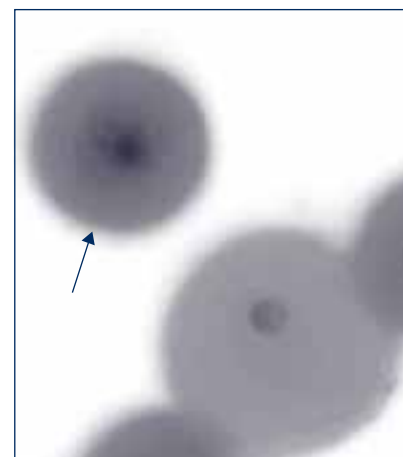


FIG. 2A (LEFT) – NATIVE PICTURE OF "PSEUDOCYSTS" WITH SINGLE-LAYERED WALL ARCHITECTURE (ARROW)

FIG. 2B (RIGHT) – CELLULOSE STAINED BY CALCOFLUOR WHITE, NUCLEI STAINED WITH PI. SINGLE LAYERED WALL ARCHITECTURE (ARROW)



DISCUSSION

It has been proven in our study, that glycogen phosphorylase has an important role during encystation in *Acanthamoeba* spp. in providing the UDP-glucose for cellulose synthesis in the inner layer of the cyst wall. Even if structure of cellulose is similar between different species, the source of glucose for its synthesis differs among them. It has been suggested, when considered the close relation of cellulose synthases and sucrose synthase, that sucrose synthase is the main enzyme generating glucose in plants. Cellulose synthesising bacteria are most probably delivering suitable levels of glucose via UDP-glucose pyrophosphorylase. *Dictyostelium discoideum* deliberates the glucose for cellulose synthesis during spore formation via activity of glycogen phosphorylase similarly to *Acanthamoeba* spp.

Glycogen phosphorylase is one of two enzymes (the second is glycogen debranching enzyme) degrading glycogen in vivo. Its expression in mammalian cells is continuous and the activity of the enzyme is regulated post-transcriptionally by phosphorylation. Protozoa evolved different regulation of metabolism – some enzymes are expressed only on demand and the regulation of the metabolism is mainly via expression. The situation is similar with *Acanthamoeba* GP. The enzyme is undetectable in the trophozoite state, where the metabolism is switched to increase and preserve the energy/sugar levels. Once the encystation is induced by specific signal (Ca^{2+} , Mg^{2+} , alkaline pH, starvation?), the enzyme is being expressed from 8th hour to 24th hour.

Our study has proven that interference with glycogen phosphorylase expression leads to incompetence of mature cysts formation. Regarding the cellulose synthesis, we have proven, that *Acanthamoebae* deprived of glycogen phosphorylase are able to finish only the first part of the cyst walls assembly – the exocyst formation. As the amount of cellulose in the exocyst is significantly smaller than in endocyst, there seems to be increased glucose demand while synthesising the latter. As trophozoites encysting in the presence of siRNAs were able to form the outer layer of the cyst, there seems to be another pathway involved in glucose formation. One of the possibilities, which cannot be definitely ruled out is involvement of glyoxylate pathway – formation of glucose from the lipidic sources via Acetyl-CoA. It has been already proven, that glyoxylate pathway is active during encystation and inhibition of the key enzyme of this pathway leads to inhibition of mature cysts formation (Mehdi et al., 1987). The question still remains if this pathway is providing the glucose for cellulose synthesis in the outer layer of the cyst wall or if it is only substituting the GP when the amount of glycogen is not sufficient. There are further studies needed to clarify the contribution of different pathways providing the glucose for cellulose synthesis during encystation of *Acanthamoeba* spp.

In conclusion, the results obtained in this study highlight the in vivo potential of RNAi technology as an attractive candidate as active components of future amoebicidal agents designed to successfully treat the *Acanthamoeba* infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by a research project MSM 0021620806 and grants GACR 310/05/H533 and GAUK 199907. The authors would also like to thank Hlávková nadace for financial support with intership in Spain.

REFERENCES

1. Dudley, R., et al. „*Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells.” *Acta Trop.* 95.2 (2005): 100-08.
2. Mehdi H., Garg NK 1987. Changes in the lipid composition and activities of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase during encystation of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 81: 633-636
3. Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16:273-307
4. Mazur, T., Hadas, E., Iwanicka, I. 1995. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* 46: 106-108
5. Mehdi, H. and N. K. Garg. „Changes in the lipid composition and activities of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase during encystation of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1.” *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 81.4 (1987): 633-36.
6. Neff, R.J. and Neff, R. H. 1969. The biochemistry of amoebic encystment. *Symposia of the society for experimental biology.* 23: 51-58
7. Potter, J. L. and R. A. Weisman. „Differentiation in *Acanthamoeba*: beta-glucan synthesis during encystment.” *Biochim.Biophys. Acta.* 20;237.1 (1971): 65-74.
8. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386 <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>
9. Sambrook et al., 1989 : Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* „ Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (Hrsg.) 2. Auflage Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
10. Stewart, J. R. and R. A. Weisman. „A chemical and autoradiographic study of cellulose synthesis during the encystment of *Acanthamoeba castellanii*.” *Arch.Biochem.Biophys.* 161.2 (1974): 488-98

2. MÍSTO

EXPERIMENTAL AND NUMERICAL ANALYSES OF THE TEMPOROMANDIBULAR DISC

Authors: Radek Jirman^{a,*}, Martina Fričová^b, Zdeněk Horák^b, Jan Kryštůfek^b, Svatava Konvičková^b and Jiří Mazánek^a

Supervisor: prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc., Department of Stomatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital



Radek Jirman

^a Department of Stomatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, ^b Laboratory of Biomechanics, Czech Technical University in Prague

ABSTRACT

This project is the beginning of a large research work with a goal to develop a new total replacement of temporomandibular (TM) joint. First aim of this work was to determine the relative displacement of the TM disc and the mandible during mouth opening. The movement of the TM disc was studied using a magnetic resonance imaging. Sagittal static images in revolved sections of the TM joint were obtained in various positions of jaw opening from 0 to 50 mm. The results provided a description of the TM disc displacements as a function of jaw opening. The displacements of the mandible and TM disc were about 16 mm and 10 mm respectively at mouth opening of 50 mm, maximum rotation of the mandible was 34°. The results of these measurements can be used for clinical diagnostics and also they were used as inputs for the follows finite element analysis (FEA). Second aim of this work was to create stress and strain analysis of TM joint using non-linear FEA. Complex of TM joint consists of mandibular disc, half skull and half mandible during normal jaw opening. The results illustrate the stress distributions in the TMJ during a normal jaw opening.

Keywords: Temporomandibular joint, Motion, Disc displacement, Kinematics, FE Analysis

1. INTRODUCTION

Problem of face and jaw disorders is very extensive and complex, and it requires much effort to elaborate and implement new curative procedures and renew the function and shape of the orofacial area with respect to the patient. It is estimated that 20% of the population suffers from temporomandibular disorders (TMD). Several studies have reported disc perforations and degeneration of the articulating surfaces [10]. Any TM disc motion derangement during mouth opening will significantly influence TMD. From the anatomical and biomechanical point of view, the temporomandibular joint (TMJ) is a sophisticated bicondylar articulatory complex that places high demands on neuromuscular control with a frequency of motion indicated up to 2000 periods per day. This makes the TMJ one of the most frequently exerted joints in the human body, which in conjunction with the individual uniqueness of this joint place high demands on its design and reliability.

This project is the beginning of a large research work with a goal to develop a new total replacement of TMJ. Temporomandibular joint replacement is very sophisticated and with individual approach to patient. For successful development of the TMJ replacement is very important to know several conditions. First of them is to understand and to know how to describe the relative motion of the system of TMJ parts. It is therefore necessary to perform experimental measurements in order to observe this physiological movement. Condylar and TM disc displacements are useful in understanding the etiology of the disease and in evaluating treatment. The movement of the TM disc during jaw opening and closure is very sophisticated. It was difficult to depict its motion exactly, because the disc shape changes significantly during the motion. The number of experimental studies is limited, because it is difficult to insert experimental devices, such as strain gauges, into the joint without causing damage to its tissues and influencing their mechanical behaviour. In several studies, condylar motion has been studied directly with the use of MRI [4, 8, 16], videoanalysis [20], or ultrasound imaging [3]. The data obtained from this experimental measurement during jaw opening was measured only for a maximum distance between central lower and upper incisors of 17 mm. In fact, the maximum comfortable mouth opening is greater (approx. 30-50 mm), and moreover, there were no references about TM disc displacement. Experimental and numerical studies concerning jaw movement and the distribution of the loads in the TMJ have been performed in many models [1, 6, 7, 14]. However, the TM disc is crucial for proper TMJ function, and it has been omitted or simplified in many numerical models and experiments [2, 7, 15].

Second necessary condition for successful development of the TMJ replacement is to know distribution of the loads in the TMJ. Mathematical models of the human masticatory system including the TMJ have been demonstrated to be a powerful tool to predict the loads acting on this joint [1, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 17]. However, many studies have oversimplified the geometry and behaviour of the TM disc. Therefore, the tissue deformations and the distribution of loads inside the joint could not be analyzed. Numerical modelling can provide with further of the understanding physiology of the joint but also pathogenesis of the joint diseases. Application of the finite element stress analysis technique to the biomechanical investigation of the TMJ is very suitable. Finite element analyses of TMJ were created by many authors [1, 5, 12, 14, 15], but in this analysis was used some simplification. Problems of all FE analyses are definition of the muscle forces,



movement of the TM disc during jaw opening and definition of TM disc material properties. Some analyses were created as 2D contact problems or separated parts were analyzed. Results of these analyses were affected by the boundary conditions and complexity of the models. Therefore it was necessary to create complex three-dimensional model of TMJ as global system of the skull, mandible, TM disc, ligaments and muscles. Contacts interactions were defined between the TM disc and the skull and between the TM disc and the mandible.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Kinematics of the TM disc

The experimental measurements were obtained on one volunteer (male, 25 years old) – only one TMJ with no abnormalities. Our measurement method is based on [4]. Imaging was carried out at the Radiodiagnostic clinic of the 1st Medical Faculty at Charles University. The measuring device was Intera 1.5 T (Philips), and the subject was scanned into 3 mm thick slices with the FFE dynamic scan sequence in the image plane of the slices. The head was fixed to avoid major displacements; smaller displacements such as swallowing and position discomfort of the head were corrected using the geometric transformation described below. The image plane was rotated from a mid-sagittal plane of 30° in the direction of the jaw (Fig. 1). Image plane sections of TMJ were scanned in the specified location of jaw opening from 0 to 50 mm (distance between central lower and upper incisors) using a customised 1directional “spreader” device. We used a Vernier calliper design and proposed an appropriate shape for convenient mouth opening. Six static mouth opening positions were obtained, starting with the maximum jaw opening (50 mm) and proceeding to closure (0 mm), and an MR image of the TMJ was taken for each position. It was necessary to minimize the imaging time over which

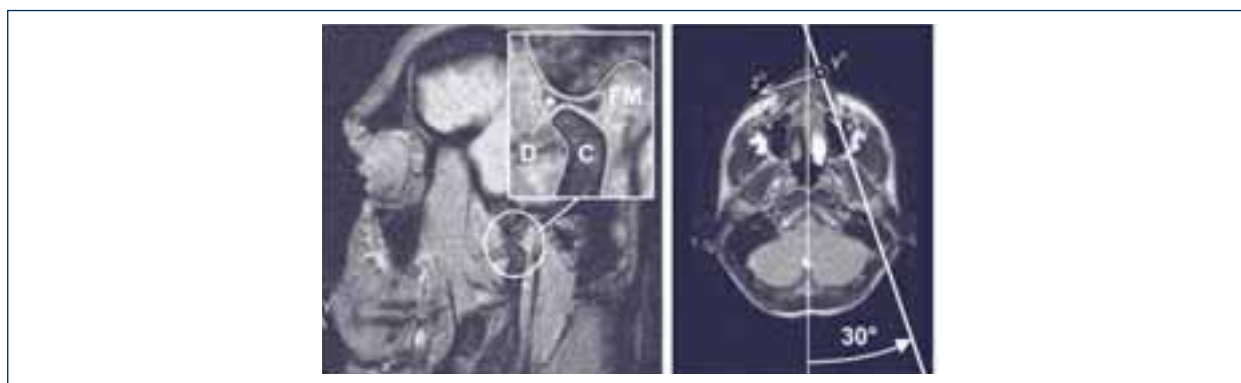


FIG. 1. MR IMAGE OF THE TMJ AT THE MID-OPENING OF THE MANDIBLE WITH INITIAL POINT AND DEFINED CCS; IMAGE PLANE WITH THE HIGHLIGHTED CONDYLE – C, FOSSA MANDIBULARIS – FM AND THE TM DISC – D (ON THE LEFT), ROTATION OF IMAGE PLANE FROM MID-SAGITTAL PLANE (ON THE RIGHT).

the patient must keep the jaw open. This can be uncomfortable for the patient in the supine position, as saliva collects in the back of the pharynx [8, 11].

The contours of the TMJ components: fossa mandibularis and tuberculum articulare on the skull, the mandible condyle and the TM disc were taken from the MR images. These contours were traced in one slice (our chosen image plane) by parametric curves defined by the number of points for each part of the joint. We assigned two points at each end of the

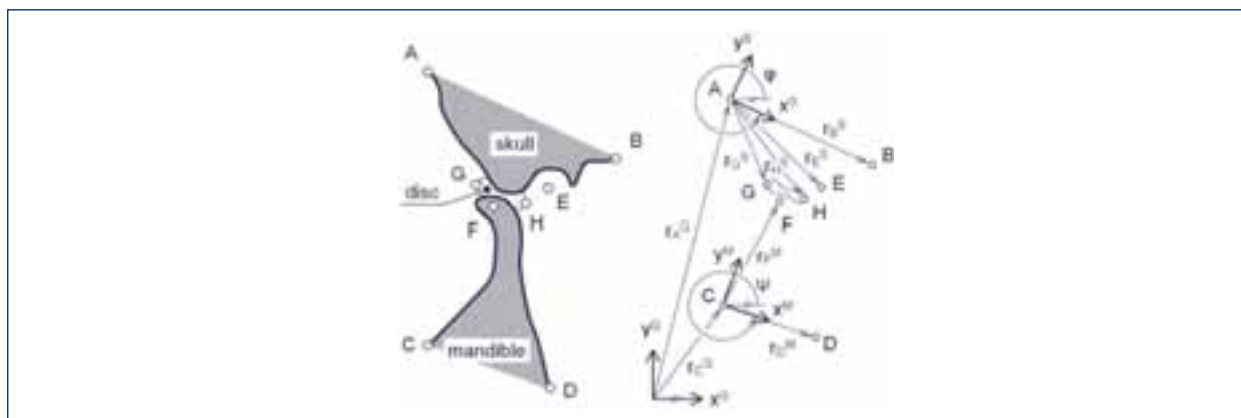


FIG. 2. CONTOURS OF TMJ PART WITH ASSIGNED REFERENCE POINTS FROM A TO H FOR MAXIMUM MOUTH OPENING (ON THE LEFT); DEFINED COORDINATES SYSTEMS, INDEX G – GLOBAL CCS, INDEX S – LOCAL CCS OF THE SKULL AND INDEX M – LOCAL CCS OF THE MANDIBLE (ON THE RIGHT).

curve; there were set points A, B and C, D on the skull and on the mandible condyle, respectively (Fig. 2). One reference point (marker) was assigned for the fossa mandibularis – point E, and also for the mandibular condyle – point F (Fig. 2). The positioning of the reference point was hard to define due to the broken shapes of the biological structures. We determined the points as intersection of normals (centre of curvature) on the above mentioned contours (points E and F related to skull and mandible, respectively, Fig. 2). It was more difficult to decide how to deal with the disc reference points, because the TM disc changed its shape significantly during the motion. The only solution that we found was to define markers for each mouth opening in the location of the muscle and ligament conjunction, points G, H respectively, because these particular points could be explicitly defined.

The displacements for each part of the TMJ were obtained from the sequence of the contour transformation (trajectories of all points are shown in Fig. 3). First, the transformation described the position of all reference points into the local coordinate system of the skull (index S). A global (index G) Cartesian coordinate system (CCS) was chosen to coincide with the coordinate system in the MR image (Fig. 1). The first MR image (assigned as the n-th index) was established as a reference image. Second, all markers were transformed from the local coordinates (from the above-mentioned transformation) into the global coordinate system for all mouth opening positions; the temporal bone points A, B and E were identical for all positions. This was essential, because although the head was fixed, the skull might move towards the skin during the examination. The third was the transformation of point F into the coordinate system from the global CCS to the local CCS of the mandible (index M). Finally, point F (local CCS of the mandible) was translated and rotated into the global coordinate system for all mouth opening positions. The four transformations can be described by the following instructions [18]:

1. Coordinate transformation of reference points B, C, D, E, G and H from the global (upper index G) Cartesian coordinate system to local CCS of the skull (upper index S) respectively for $i=1, 2, \dots, n$, when n is position number of jaw opening (in our case $n=6$) and \mathbf{r} indicates extended radius vector.

$$\mathbf{r}_{Bi}^G, \mathbf{r}_{Ci}^G, \mathbf{r}_{Di}^G, \mathbf{r}_{Ei}^G, \mathbf{r}_{Gi}^G, \mathbf{r}_{Hi}^G \rightarrow \mathbf{r}_{Bi}^S, \mathbf{r}_{Ci}^S, \mathbf{r}_{Di}^S, \mathbf{r}_{Ei}^S, \mathbf{r}_{Gi}^S, \mathbf{r}_{Hi}^S$$

2. Correction of points B, C, D, E, G and H position in global CCS respectively for $i=1, 2, \dots, n$, when n is the number of the jaw opening position.

$$\mathbf{r}_{Bi}^S, \mathbf{r}_{Ci}^S, \mathbf{r}_{Di}^S, \mathbf{r}_{Ei}^S, \mathbf{r}_{Gi}^S, \mathbf{r}_{Hi}^S \rightarrow \mathbf{r}_{Bni}^G, \mathbf{r}_{Cni}^G, \mathbf{r}_{Dni}^G, \mathbf{r}_{Eni}^G, \mathbf{r}_{Gni}^G, \mathbf{r}_{Hni}^G$$

3. Coordinate transformation of point F from global (index G) CCS to local CCS of mandible (index M)

$$\mathbf{r}_{Fn}^G \rightarrow \mathbf{r}_{Fn}^M$$

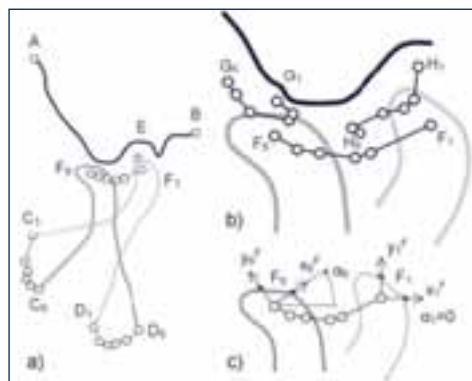


FIG. 3. SCHEME OF THE REFERENCE POINT MOTION (INDEX 1 MOUTH IS CLOSING, INDEX 6 MOUTH IS OPENED TO THE MAXIMUM): (A) SCHEME OF THE MANDIBULAR CONDYLE MOVEMENT, (B) IMAGE DETAIL OF THE TM DISC REFERENCE POINT MOVEMENT, (C) COORDINATE SYSTEM FOR GRAPHIC INTERPRETATION OF THE REFERENCE POINT MOTION.

4. Computation of another position ($i=1, 2, \dots, n-1$) of jaw opening was done in global CCS.

2.2. FE analysis of the TM joint

The geometry of the model was obtained from the head of embalmed male cadaver, showing no abnormalities, using a CT and MRI scans. Muscles and ligaments were additionally modeled in to the CAD program according to the anatomical knowledge. Only half of the skull and mandible were used for simplification of the FE analysis. Geometrical model of the TMJ is shown in (Fig. 4.). Model of the TMJ was exported from the CAD program in to the automated mesh generator NETGEN, where were generated four-noded tetrahedral elements of the skull and mandible. TM disc was meshed by eight-noded brick elements in to the TrueGrid® mesh program. Finally muscles were defined by connector elements.

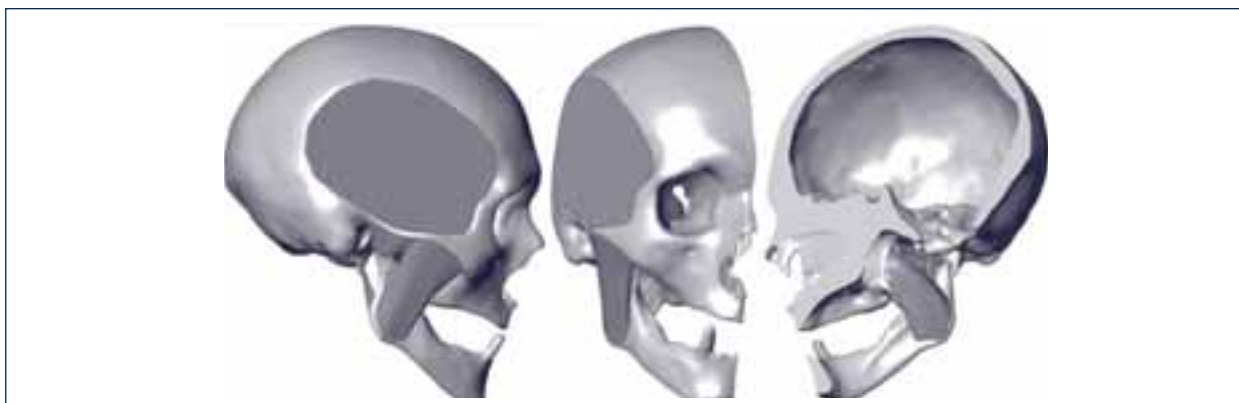


FIG. 4. GEOMETRICAL MODEL OF THE SKULL AND MANDIBLE. ALL MUSCLES AND LIGAMENTS ARE SHOWN.

This special element allows various definitions of the material properties, loading forces and the element behaviour. Connector element type axial was used for this application. This type provides a connection between two nodes where the relative displacement is along the line separating the two nodes.

It models discrete physical connections such as axial springs, axial dashpots, or node-to-node (gap-like) contact. The axial connection does not constrain any component of relative motion. The available component of relative motion u acts along the line connecting the two nodes, measures the change in distance separating the two nodes. Muscles represented by connector elements were linked with mandible and skull by distributed coupling constraints. This represented muscle insertion in to the bone. The coupling constraint provides coupling between a reference node and a group of nodes. Distributing coupling constrains the motion of the coupling nodes to the translation and rotation of the reference node. This constraint is enforced in an average sense in a way that enables control of the transmission of loads through weight factors at the coupling nodes. The constraint distributes loads such that the resultants of the forces at the coupling nodes are equivalent to the forces and moments at the reference node. FE model of the TMJ is shown in (Fig. 5.).

TABLE 1. MATERIAL PROPERTIES OF THE TMJ COMPONENTS

Material	Young's modulus [MPa]	Poisson's ratio [-]
Bone	16300	0.31
Ligaments	1200	0.28
Tooth	19000	0.3
TM Disc	16	0.45

FE analysis was defined as a nonlinear contact task and solved in ABAQUS 6.6 (Hibbit, Karlsson, Sorensen, Inc., Providence, RI). Contact interactions were defined between the TM disc and the skull and between the TM disc and the mandible. All contacts were defined as surface to surface slide contact. The coefficient of friction for articular surfaces

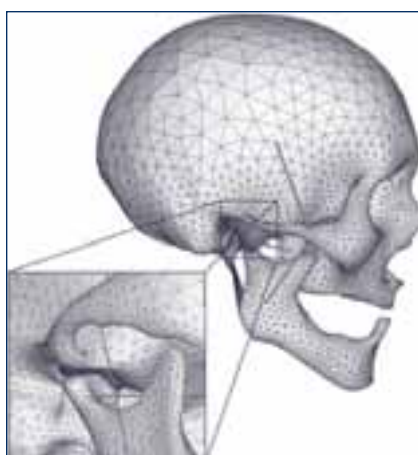


FIG. 5. FE MODEL OF SKULL AND MANDIBLE. ALL MUSCLES (RED LINES), ALL LIGAMENTS (GREEN) AND TM DISC (BLUE) IN DETAIL WERE SHOWN.

is unknown. It was estimated that the coefficient of friction must be smaller than 0.15 because of the existence of the synovial fluid. Coefficient of friction was estimated 0.08. The FE model consisted of 180 eight-noded elements, 54578 four-noded tetrahedral elements, and 48 connector elements. Total number of nodes was 16665. Data on the material properties of all TMJ parts were taken from published data. The bone of the skull and mandible were considered to be isotropic and linear elastic. Tooth and ligaments were also defined as isotropic and linear elastic. Because range of magnitude TM disc material properties in published data is big, Young's modulus and Poisson's ratio were estimated. TM disc was also defined as homogenous and isotropic. All material properties assigned to the structural elements are listed in (Table 1.) [15, 19].

Advantage of using connector element was the possibilities apply resultant forces directly. Geometrical parameters are completely defined by the muscle insertion in the bone. Normal jaw clenching was used for this analysis and forces were applied in connector elements. All forces were assumed to be symmetrical and had equal magnitude on the right and left side of the mandible. Magnitudes of all applied forces were taken from published data [2, 8, 13]. Symmetry boundary conditions were applied on the sagittal surfaces of the skull and mandible. Base of the skull was constrained and tooth displacement in the z-direction was constrained for normal jaw clenching simulation. All applied forces are listed in (Table 2.).

TABLE 2. MUSCLE FORCES CORRESPONDING WITH MAXIMAL JAW CLENCHING

Muscles	Force [N]
Lateral pterygoid	378.0
Medial pterygoid	191.4
Temporalis	528.6
Masseter	340.0

3. RESULTS

The results of the experimental measurements showed the motion of the TM disc and the mandible markers during mouth opening. Fig. 3. shows an example of the opening movement path of the reference points. We observed the relative motion of the TM disc and the mandible in the x-axis and in the y-axis and also the rotation depending on the mouth opening (Fig. 6., Table 3.). Regression of the measured points coordinates, depending on mouth opening, represents a third- or second-order polynomial curve (Fig. 6). A correlation coefficients range from $R^2=0.97$ to $R^2=0.99$. The movement of the TM disc is shown in Fig. 6 and the reference points G, H displacements are described in Table 3. which show the TM disc behaviour during jaw opening. The motion of the mandibular condyle was investigated in two directions and one angle. The initial position was established for a closed mouth, where the angle was considered as 0° , so that the displayed angle was absolute. Fig. 6. and Table 3. show that the maximum displacement in the x-direction was 15.81 mm, and in the y-direction it was 3.33 mm. So the maximum translational displacement was 15.85 mm and the maximum rotation of the mandibular condyle was 34.39° (Fig. 6., Table 3.).

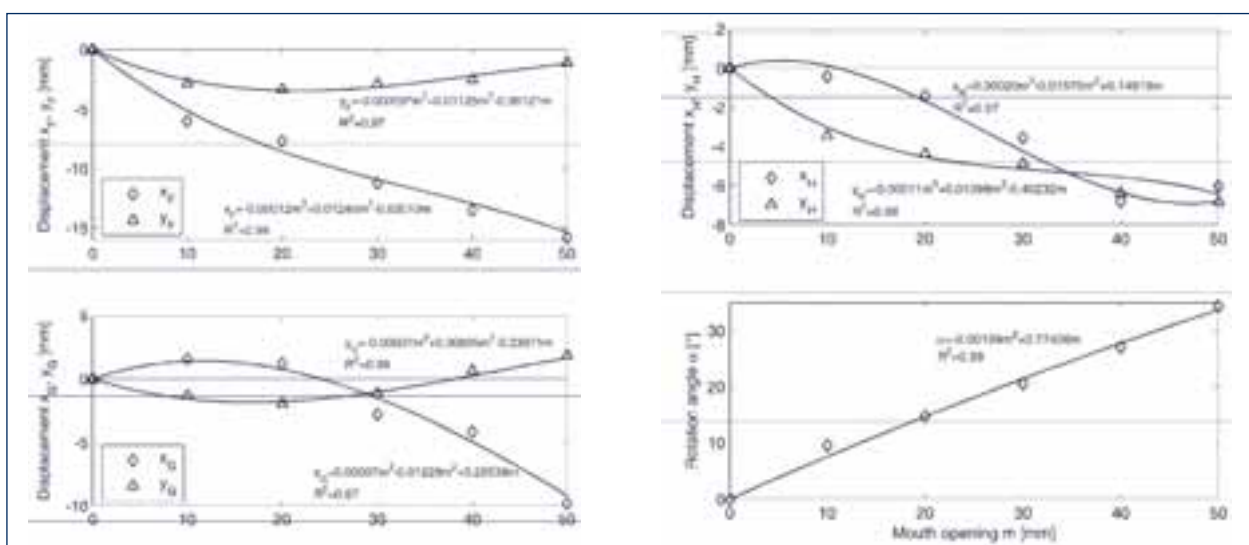


FIG. 6. DISPLACEMENT OF REFERENCE POINTS ON THE TM DISC AND THE MANDIBULAR CONDYLE (FROM TOP): MOTION OF MANDIBLE REFERENCE POINT F; RELATIVE MOTION OF THE TM DISC REFERENCE POINTS G AND H; ROTATION OF MANDIBLE ABOUT REFERENCE POINT F.

TABLE 3.: VALUES OF DISPLACEMENT OF ALL REFERENCE POINTS F, G, H IN THE SPECIFIED DIRECTORY AND ROTATION OF MANDIBULAR REFERENCE POINT F.

m [mm]	α [°]	Mandible Point F [mm]		TM disc Point G [mm]		TM disc Point H [mm]	
		x	y	x	y	x	y
0	0	0	0	0	0	0	0
10	9.46	-6.01	-2.82	1.53	-1.31	-0.43	-3.45
20	14.75	-7.69	-3.33	1.20	-1.93	-1.40	-4.37
30	20.53	-11.26	-2.86	-2.80	-1.13	-3.55	-4.86
40	27.10	-13.51	-2.53	-4.17	0.66	-6.79	-6.38
50	34.39	-15.81	-1.10	-9.83	1.85	-6.03	-6.82

The results of the FE analysis illustrate the stress distributions in the TMJ during a normal jaw clenching. The stress distributions from this model are given in (Fig. 7. and Figure 8.). High von-Misses stresses were seen at the mandible near the processus coronoideus. The maximum von Misses stress was about 5.5 [MPa]. High contact pressures were seen at the contact surface on the TM disc, contact was defined between TM disc and mandible. The maximum contact pressure was about 6.3 [MPa]. Maximal von Misses stress on the skull were located on the arcus zygomaticus, where is connected m. Masseter with the skull. The maximum von Misses stress was about 3 [MPa]. The forces in the ligaments were quite small. The maximum ligament forces were located in the joint capsule (0.3 N).

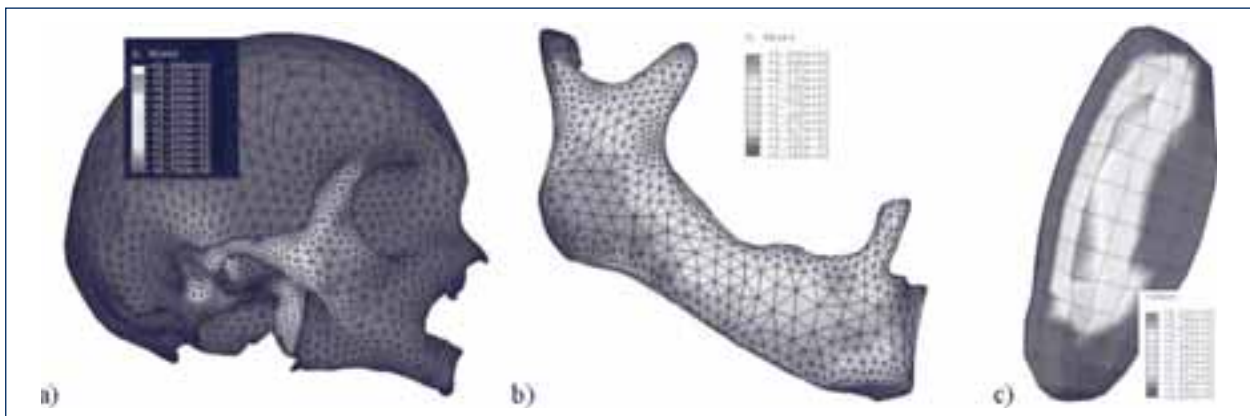


FIGURE 7: DISTRIBUTION OF THE VON MISSES STRESSES [MPa] IN THE SKULL (A) AND MANDIBLE (B) AND DISTRIBUTION OF THE CONTACT PRESSURES [MPa] IN THE TM DISC (C).

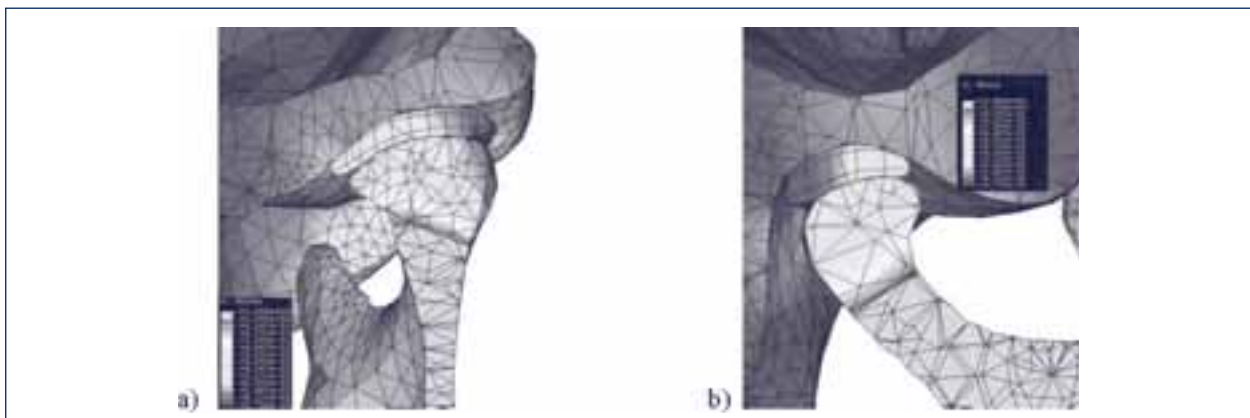


FIGURE 8: DISTRIBUTION OF THE VON MISSES STRESSES [MPa] IN THE TEMPOROMANDIBULAR JOINT. VIEW OF THE FRONTAL PLANE (A) AND SAGITAL PLANE (B).

4. DISCUSSION

The TM disc plays a crucial role in TMJ motion; it is therefore necessary to know its mechanical behaviour as well as its movement. The displacement of the mandibular condyle was described in previous publication [4] for maximum mouth

opening of 17 mm. This is not the maximum comfortable mouth opening, so it was necessary to broaden these measurements. In addition, there was no investigation of TM disc movement. The results for mouth opening of 17 mm have been used for computing FEA [14], but the results of this analysis must be insufficient. Our measurement method is based on [4], but we obtained a more complex description of the mandible and especially of TM disc behaviour. From our study we obtained the displacement of the TM disc and of the mandible condyle in relation to mouth opening. The maximum mouth opening was 50 mm; this distance was defined between lower and upper incisors. This study shows that the condyle first moves down and forward (downward and anteriorly) and then rotates open. This motion is shown in Fig. 6. MRI is a non-invasive method which can be used easily and efficiently for visualization of soft tissues. Adjusting the MRI device was crucial. There are many scanning techniques, but in most of them the disc is not easily observed. Next, there can be significant loss due to slice thickness. Several experiments with MR specialists led to a proper scanning sequence. Finally, the precision of the results is also limited by the quality of the MR images and by the accuracy of the contours of the TMJ part. All parts were shaped according to their anatomical geometry in cooperation with an experienced dentist. One of the main disadvantages was that the individual quasi-static images that were analyzed in this initial study did not capture everything that was truly seen when examining the TMJ in motion. In [4] the motion of the mandibular condyle was studied for the reference point defined on the condyle, which does not seem to be precise. In our approach, the centre of the curvature should be a more exact description of the reference point. Another disadvantage of the approach is that there were just two dimensions. Improvement into a three-dimensional scheme will surely be one of the first future developments. The spatial conception needs to be more accurate due to the extremely complex shape of the TM disc. A further disadvantage was that only one subject on one side of the joint was examined. A study is already in progress to overcome this disadvantage. We intend to supplement some statistical evaluation to enhance the statements presented here.

The study provided a three-dimensional model of the temporomandibular joint. The presented model, as far as we know, is the first complete three-dimensional model. All parts of the TMJ were shaped according to its anatomical geometry which was sampled with high resolution. This study verified applied model in the real situation during a normal jaw clenching. Stresses in the joint components (disc, mandible, skull and ligaments) with a normal jaw clenching have been analyzed. Results of this analysis shown, that the numerical simulation of this geometrically complicated joint is possible by the FEM. Compared with the results taken from published data [1, 5, 6], the stress distribution in the TM disc are corresponding. In this model were used simple material definitions, but this pilot study was make for model verification. Next simplification was ligaments simulation by the connector elements. Finally the model didn't include deformable cartilage layers on the articulating surfaces of mandible and skull. All of these simplifications will be change in the next generation of the TMJ model.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Ministry of Education project: Transdisciplinary research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012 and by the Czech Science Foundation project: „Application of synthetic biomaterials for replacement of orofacial parts of skull“, No. CSF 106/07/0023.

REFERENCES

1. Beek, M., Koolstra, J.H. et al. Three-dimensional finite element analysis of the human temporomandibular joint disc. *Journal of Biomechanics* 2000; 33 (3), 307-316.
2. Beek, M., Aarnts, M. P., Koolstra, J.H. et al. Dynamic properties of the human temporomandibular joint disc. *Journal of Dental Research* 2001; 80 (3), 876-880.
3. Braun, S., Hicken, J.S. Ultrasound imaging of condylar motion: a preliminary report. *Angle Orthodontist* 2000; 70 (5), 383-386.
4. Chen, J., Buckwalter, K. Displacement Analysis of the Temporomandibular Condyle from Magnetic Resonance Images. *Journal of Biomechanics* 1993; 26 (12), 1455-1462.
5. Chen, J., Xu, L. A Finite Element Analysis of the Human Temporomandibular Joint, *J. of Biomechanical Engineering*, 116, pp. 401-407, 1994.
6. Choi, A. H., Ben-Nissan, B., Conway, R. C. Three-dimensional modelling and finite element analysis of the human mandible during occlusion. *Australian Dental Journal* 2005; 50 (1), 42-48.
7. Donzelli, P. S., Gallo, L. M., Spilker, L. R. et al.. Biphasic finite element simulation of the TMJ disc from in vivo kinematic and geometric measurement. *Journal of Biomechanics* 2004; 37 (1), 42-48.
8. Drace, J. E., Enzmann, D. R. Defining the Normal Temporomandibular Joint: Closed-, Partially Open-, and Open-Mouth MR Imaging of Asymptomatic Subjects. *Radiology* 1990; 177 (1), 67-71.
9. Hattori, Y., Satoh, C., Seki, S., Watanabe, Y., Ogino, Y., Watanabe, M. Occlusal and TMJ Loads in Subjects with Experimentally Shortened Dental Arches. *J. of Dental Research*, 82 (7), pp. 532-536, 2003.
10. Jergenson, M., Barton, J. The occurrence of TMJ disc perforations in an aging population. *Journal of Dental Research* 1998; 77(5), 264.
11. Katzberg, R. W. Temporomandibular Joint Imaging. *Radiology* 1989; 170 (2), 297-307.
12. May, B., Saha, S., Saltzman, M. Three-dimensional mathematical model of temporomandibular joint loading, *Clinical Biomechanics*, 16, pp. 489-495, 2001.
13. Nickel, J.C., Iwasaki, L.R., Walker, R.D., McLachlan, K.R., McCall, W.D. Human Masticatory Muscle Forces during Static Biting, *J. of Dental Research*, 82 (3), pp. 2122-2127, 2003.

14. Perez del Palomar A, Doblare M. 3D Finite Element Simulation of the Opening Movement of the Mandible in Healthy and Pathologic Situations. *Journal of Biomechanical Engineering* 2006; 128 (2), 242-249.
15. Perez del Palomar A, Doblare M. The effect of collagen reinforcement in the behaviour of the temporomandibular joint disc. *Journal of Biomechanics* 2006; 39 (6), 1075-85.
16. Peterova, V., Jirman, R., Mazanek, J., Seidl, Z. The Examination of the Temporomandibular Joint on 1,5T Magnetic Resonance. *Prague Medical Report* 2004; 105 (4): 29-34.
17. Sellers, W.I., Crompton, R.H. Using sensitivity analysis to validate the predictions of a biomechanical model of bite forces, *Annals of Anatomy*, 186, pp. 89-95, 2004.
18. Stejskal, V., Valasek, M. *Kinematics and dynamics of machinery*, Marcel Dekker Inc., New York (NY), USA, 1996.
19. Tanaka, E., van Eijden, T. Biomechanical Behaviour of the Temporomandibular Joint Disc, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 14 (2), pp. 138-150, 2003.
20. Yatabe, M., Zwijnenburg, A., Megens, C.C.E.J., Naeije, M. Movements of the Mandibular Condyle Kinematic Center during Jaw Opening and Closing. *Journal of Dental Research* 1997; 76 (2), 714-719.



První místo v sekci postgraduální – postery obsadila MUDr. Jarmila Klieščíková.

3. MÍSTO

**IDENTIFIKACE NOVÝCH MUTACÍ V GENU ZEB1
U ČESKÝCH A BRITSKÝCH PACIENTŮ SE ZADNÍ
POLYMORFNÍ DYSTROFIÍ ROHOVKY**

Petra Lišková

Authors: Petra Lišková, Rhian Gwilliam, Neil D. Ebenezer, Marike Pretorius, Alison J. Hardcastle, Martin Filipec, Shomi S. Bhattacharya
Supervisor: prof. MUDr. Martin Filipec, CSc., Laboratoř biologie a patologie oka 1. LF UK a VFN

ABSTRAKT

Úvod: Cílem práce byla identifikace mutací v šesti českých vzájemně nepříbuzných a čtyřech britských rovněž vzájemně nepříbuzných rodinách se zadní polymorfní dystrofií rohovky (posterior polymorphous corneal dystrophy; PPCD); relativně vzácného očního onemocnění.

Metodika: Pomocí přímého sekvenování byl proveden screening kódujících exonů a hranic intronů s exony všech třech genů (VSX1, COL8A2 a ZEB1/TCF8), které byly zatím popsány jako PPCD podmiňující. V českých rodinách bylo dále provedeno genotypování markerů v lokusu 20p11.2 za účelem testování možného zakladatelského efektu.

Výsledky: Identifikovány byly čtyři nové patogenní mutace ve čtyřech rodinách; dvě delece, jedna terminační mutace a jedna duplikace v exonu 7 ZEB1 genu nacházejícím se v lokusu 10p11.2. Genotypování českých rodin neprokázalo stejný haplotyp jako u jiných dříve popsáných dvou rodin mapovaných do oblasti 20p11.2.

Závěr: Naše práce potvrzuje roli ZEB1 genu v patogenezi PPCD a poukazuje na genetickou heterogenitu tohoto onemocnění. Absence nálezu příčinných mutací v šesti rodinách naznačuje, že PPCD je pravděpodobně způsobena dalšími dosud neidentifikovaným(i) genem nebo geny.

INTRODUCTION

Posterior polymorphous corneal dystrophy (PPCD) is a relatively rare bilateral eye disorder that primarily affects the endothelium and Descemet's membrane (Krachmer, 1985). It is usually transmitted as an autosomal dominant trait, although an autosomal recessive mode of inheritance has also been suggested in some pedigrees (Cibis, et al., 1977; Soukup, 1964). Clinically, PPCD is characterized by vesicles, bands and geographic opacities of the posterior corneal layers. In a minority of cases peripheral anterior iris adhesions, iris atrophy, corectopia, corneal edema, and glaucoma develop as secondary changes (Cibis, et al., 1977; Laganowski, et al., 1991). The disease shows significant intrafamilial phenotypic variability with incomplete penetrance (Cibis, et al., 1977; Krafchak, et al., 2005). Ultrastructure examination shows thickening of Descemet's membrane and fibroblastic and epithelial-like transformation of the endothelial cells, including an ability to divide (de Felice, et al., 1985; Polack, et al., 1980; Henriquez, et al., 1984).

Posterior polymorphous dystrophy is genetically a heterogeneous disease. PPCD1 (MIM# 122000) was mapped to chromosome 20 (Heon, et al., 1995). Mutations in a visual system homeobox gene 1 (VSX1; MIM# 605020) within the original linked interval were implicated as disease causing in some PPCD patients (Heon, et al., 2002; Valleix, et al., 2006). However, this finding was not confirmed by other reports which excluded VSX1 by linkage analysis and by direct sequencing (Gwilliam, et al., 2005; Aldave, et al., 2004). Linkage data indicates that there is another, as yet unidentified, PPCD1 gene on chromosome 20p11.2 (Gwilliam, et al., 2005). PPCD2 (MIM# 609140) is caused by the alpha-2 chain of type VIII collagen gene (COL8A2; MIM# 120252) located on 1p34.3-p32.3 with one disease causing mutation identified to date (Biswas, et al., 2001). Most recently, three frame shift and two nonsense mutations in five unrelated PPCD3 (MIM# 609141) families have been reported in a zinc finger E-box binding homeobox 1 gene (ZEB1; MIM# 189909), also known as human zinc finger transcription factor 8 (TCF8), mapped to chromosome 10p11.2. It was estimated that changes in this gene may account for about 50 % of all PPCD cases (Krafchak, et al., 2005).

We have screened the coding regions of three genes implicated in PPCD (ZEB1, COL8A2 and VSX1) in ten unrelated families, six of Czech origin and four of British origin. Four novel pathogenic mutations within the ZEB1 gene were detected in four families, supporting the importance of ZEB1 mutations in the pathogenesis of PPCD and lack of a founder ZEB1 mutation in the Czech PPCD population.

MATERIAL AND METHODS**Clinical evaluation**

The study followed the tenets of the Declaration of Helsinki and had local Ethics Committee approval. After obtaining signed informed consent, 36 individuals from six white Czech and four white British families underwent standard ophthalmologic examination including visual acuity, intraocular pressure measurement and biomicroscopy. Patients were diagnosed with PPCD if they exhibited the characteristic endothelial changes in both eyes (Krachmer, 1985; Cibis, et al., 1977). A detailed family and personal history was taken and pedigrees constructed. The Czech families in this study did not come from the same region of the Czech Republic as the two large families with PPCD1 who were previously mapped to chromosome 20p11.2 and in which VSX1 was excluded as a candidate gene (Gwilliam, et al., 2005).

DNA extraction, PCR amplification

Blood samples (10 ml) were taken from participating family members. DNA was prepared from peripheral blood leucocytes using the Nucleon III BACC3 genomic DNA extraction kit according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, UK). Each coding exon along with exon-intron junctions of the published reference sequences of ZEB1 (NCBI Accession NM_030751.2), COL8A2 (NCBI Accession NM_005202.1) and VSX1 (NCBI Accession NM_014588.4 and NM_199425.1) genes was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using forward and reverse pairs of primers. Amplification was carried out in a 25 µl mixture containing 12.5 µl of ReddyMix™ PCR master mix (ABgene, UK), with 50 pmoles gene-specific primers and approximately 50 ng of genomic DNA.

Haplotype analysis

Polymorphic fluorescently-labeled microsatellite markers D20S98, D20S114, D20S48, D20S605, D20S182, M189K21, D20S139, D20S106 were amplified in patients from all six Czech families and analyzed using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) as previously described (Gwilliam, et al., 2005).

Mutational analysis

The PCR amplicons were purified with Montage PCR₉₆ Cleanup Kit (Millipore, USA) and sequenced for both strands. Direct sequencing of all gene fragments was performed using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) on a fluorescent sequencer (ABI 3100) in accordance with the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences were compared with the published reference sequences. Mutation nomenclature follows HGVS recommendations with +1 as A of ATG initiation codon (Antonarakis, 1998; den Dunnen and Antonarakis, 2000). One affected individual from each of the ten families was used for initial mutational screening. Where sequence changes were identified, other available affected and unaffected family members were sequenced to confirm segregation with disease, as well as 51 white Czech and 94 white British unrelated population control individuals to confirm potential pathogenicity.

RESULTS

Following detailed clinical examination, 24 family members (14 males, 10 females) from ten families were diagnosed with PPCD. Previously we described a haplotype consisting of alleles for eight microsatellite markers in two Czech families showing linkage to 20p11.2 (Gwilliam, et al., 2005). However, the six families in the current study do not exhibit a haplotype similar to the previously published families indicating a lack of founder effect and further genetic heterogeneity in the Czech population. All three previously reported PPCD genes were therefore analysed in these families. Sequence analysis of the ZEB1 gene revealed a heterozygous single-base duplication, c.2324_2325dupA, in exon 7 that co-segregated with all three affected members of family C1 of Czech origin (Fig. 1a) and was also found in the clinically unaffected mother. The mutation is predicted to result in a frame shift at codon 776 (p.E776fs) leading to a termination codon 43 residues downstream of the mutation site.

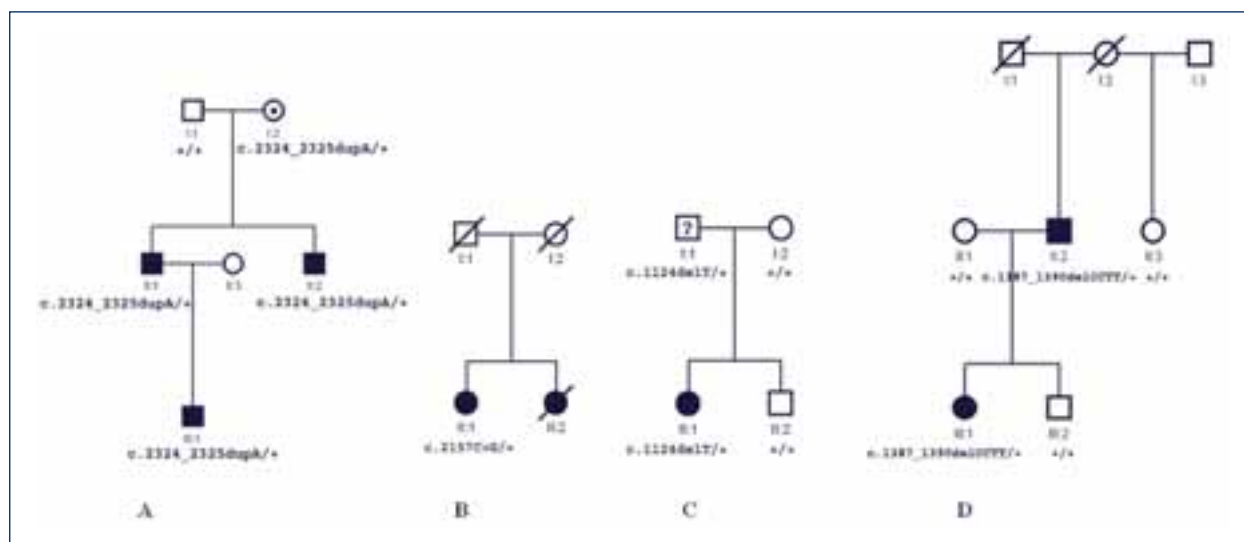


FIGURE 1: PEDIGREES OF PPCD FAMILIES WITH NOVEL MUTATIONS IN THE ZEB1 GENE IDENTIFIED IN THIS STUDY. A: CZECH FAMILY C1 SHOWING A HETEROZYGOUS SINGLE-BASE DUPLICATION C.2324_2325DUPA RESULTING IN A FRAME SHIFT WITH GLUTAMIC ACID AT CODON 776 (P.E776FS). B: CZECH FAMILY C2 SHOWING A HETEROZYGOUS SINGLE-BASE PAIR TRANSITION C.2157C>G CHANGING TYROSINE AT POSITION 719 TO A STOP CODON (P.Y719X). C: BRITISH FAMILY B1 SHOWING A HETEROZYGOUS SINGLE-BASE PAIR DELETION C.1124DELT RESULTING IN A FRAME SHIFT WITH PHENYLALANINE AT CODON 375 (P.F375FS). D: BRITISH FAMILY B2 SHOWING A HETEROZYGOUS FOUR-BASE PAIR DELETION C.1387_1390DELCTT RESULTING IN A FRAME SHIFT WITH PROLINE AT CODON 463 (P.P463FS).

A single-base pair transition, c.2157C>G, changing tyrosine to a stop codon at position 719 (p.Y719X) in exon 7, was identified in a member of family C2 of Czech origin (Fig. 1b). The stop codon is predicted to result in truncation of the ZEB1 protein by 406 amino acids. Only this affected individual from family C2 was available for clinical and molecular genetic analysis, however familial occurrence of the disease was demonstrated as clinical findings consistent with PPCD in this patient and her sister were reported in 1964 by Soukup (1964) who also examined 18 other family members including all first degree relatives, none of whom was clinically affected (Soukup, 1964).

A heterozygous single-base pair deletion, c.1124delT, predicted to lead to a frame shift at codon 375 (p.F375fs) and thus to an aberrant protein with 30 additional residues was found in two members from family B1 of British origin and was absent in one unaffected first degree relative (Fig. 1c). Clinical records of individual I:1 were not available and therefore the phenotype could not be ascertained.

The fourth mutation identified was a heterozygous four-base pair deletion, c.1387_1390delCCTT, predicted to result in a frame shift at codon 463 (p.P463fs) with a stop codon 28 residues after this change in two subjects from family B2 of British origin. Two unaffected relatives and a spouse did not display this mutation (Fig. 1d).

None of the novel changes identified in this study was detected in the control population of the same ethnic origin, as determined by direct sequencing of 51 Czech (102 chromosomes) and 94 British individuals (188 chromosomes).

Sequencing of the VSX1 and the COL8A2 gene did not reveal any pathogenic sequence variants. The remaining four Czech and two British pedigrees had no disease causing changes in any of the three PPCD genes.

DISCUSSION

PPCD is a genetically heterogeneous disease. It has recently been reported that changes within the ZEB1 gene are responsible for the pathogenesis in a large percentage of patients with this corneal disorder (Krafchak, et al., 2005). ZEB1 maps to chromosome 10p11.2, comprises 9 exons and encodes a transcription factor that is organized in multiple functional domains starting with N-terminal zinc finger clusters (172-292), followed by a homeodomain (581-640), repression domain (754-901), C-terminal zinc finger clusters (905-981) and acidic activation domain (1011-1124) (Ikeda, et al., 1998). We have identified four novel disease mutations within the ZEB1 gene in subjects with PPCD, in four of ten unrelated PPCD families. All of the mutations described in this report are in exon 7. The nature of these mutations, leading to frame shifts and a stop codon, and the absence of these changes in control populations confirms that they are likely to be pathogenic. Eight out of nine different mutations identified to date in the ZEB1 gene, including the four reported in this study, were in exon 7 (Krafchak, et al., 2005). It would therefore seem useful to start ZEB1 screening for sequence variants with this exon.

If protein were produced by these changed ZEB1 genes, and not eliminated due to nonsense-mediated decay of the mRNA, it would lack amino acid sequences of important functional domains. The c.1124delT and c.1387_1390delCCTT change would result in the elimination of the homeodomain, repression domain, the second cluster of zinc fingers and the acidic activation domain, while the c.2157C>G and c.2324_2325dupA mutations would result in the complete or partial elimination of the repression domain respectively, elimination of the second cluster of zinc fingers and the acidic activation domain. All mutations identified in the ZEB1 gene to date (Krafchak, et al., 2005; and this study) are nonsense or frame shift mutations predicted to lead to premature truncation of the ZEB1 protein. This suggests that haploinsufficiency is a potential disease mechanism.

Identification of ZEB1 mutations in PPCD families from two different European populations confirms that the ZEB1 gene plays an important role in the pathogenesis of this disorder worldwide. The finding in our study that in six of the ten families there were no pathogenic changes in the coding exons of ZEB1, COL8A2 or VSX1 suggests that PPCD in these patients might be caused by other unidentified mutations within the refined PPCD locus on 20p11.2 (Gwilliam, et al., 2005). The possibility also exists that more novel genes remain to be identified, or that large gene deletions and pathogenic changes in noncoding regions of the three PPCD genes may not have been detected.

PPCD caused by mutations in ZEB1 exhibits incomplete penetrance (Krafchak, et al., 2005). This feature can cause uncertainties in establishing the inheritance pattern, as in family C2 (Fig. 1b) examined by Soukup (1964) (Soukup, 1964) leading previously to speculation of a possible autosomal recessive inheritance (Tripathi, et al., 1974). In this study apparent non-penetrance was present in family C1 (Fig. 1a) in a 70 year old female. Although it cannot be excluded that disease will still develop later in her life we consider that this is unlikely given her age.

In conclusion ZEB1 appears to play a significant role in the pathogenesis of PPCD. In this study four out of 10 families were found to carry mutations in ZEB1. Proband from the remaining six families screened for all three known genes implicated in PPCD did not carry any pathogenic coding sequence variant, implying that in a large proportion of patients, the disorder is probably caused by changes in as yet identified gene(s) and that VSX1 and COL8A2 are a rare cause of PPCD. Our work supports further genetic heterogeneity for PPCD.

REFERENCES

1. Aldave AJ, Yellore VS, Principe AH, Abedi G, Merrill K, Raber I, Small KW, Udar N. 2004. Candidate Gene Screening for Posterior Polymorphous Dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(5):1526-.
2. Antonarakis SE. 1998. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11(1):1-3.



3. Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P, Sutphin JE, Noble B, Batterbury M, Kielty C and others. 2001. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet* 10(21):2415-23.
4. Cibis GW, Krachmer JA, Phelps CD, Weingeist TA. 1977. The clinical spectrum of posterior polymorphous dystrophy. *Arch Ophthalmol* 95(9):1529-37.
5. de Felice GP, Braidotti P, Viale G, Bergamini F, Vinciguerra P. 1985. Posterior polymorphous dystrophy of the cornea. An ultrastructural study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 223(5):265-71.
6. den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15(1):7-12.
7. Gwilliam R, Liskova P, Filipec M, Kmoch S, Jirsova K, Huckle EJ, Stables CL, Bhattacharya SS, Hardcastle AJ, Deloukas P and others. 2005. Posterior polymorphous corneal dystrophy in Czech families maps to chromosome 20 and excludes the VSX1 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(12):4480-4.
8. Henriquez AS, Kenyon KR, Dohlman CH, Boruchoff SA, Forstot SL, Meyer RF, Hanninen LA. 1984. Morphologic characteristics of posterior polymorphous dystrophy. A study of nine corneas and review of the literature. *Surv Ophthalmol* 29(2):139-47.
9. Heon E, Greenberg A, Kopp KK, Rootman D, Vincent AL, Billingsley G, Priston M, Dorval KM, Chow RL, McInnes RR and others. 2002. VSX1: A gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Hum. Mol. Genet.* 11(9):1029-1036.
10. Heon E, Mathers WD, Alward WL, Weisenthal RW, Sunden SL, Fishbaugh JA, Taylor CM, Krachmer JH, Sheffield VC, Stone EM. 1995. Linkage of posterior polymorphous corneal dystrophy to 20q11. *Hum Mol Genet* 4(3):485-8.
11. Ikeda K, Halle JP, Stelzer G, Meisterernst M, Kawakami K. 1998. Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor AREB6. *Mol Cell Biol* 18(1):10-8.
12. Krachmer JH. 1985. Posterior polymorphous corneal dystrophy: a disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 83:413-75.
13. Krafchak CM, Pawar H, Moroi SE, Sugar A, Lichter PR, Mackey DA, Mian S, Nairus T, Elnor V, Scheingart MT and others. 2005. Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells. *Am J Hum Genet* 77(5):694-708.
14. Laganowski HC, Sherrard ES, Muir MG. 1991. The posterior corneal surface in posterior polymorphous dystrophy: a specular microscopical study. *Cornea* 10(3):224-32.
15. Polack FM, Bourne WM, Forstot SL, Yamaguchi T. 1980. Scanning electron microscopy of posterior polymorphous corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 89(4):575-84.
16. Soukup F. 1964. [Polymorphous Posterior Degeneration of the Cornea.]. *Cesk Oftalmol* 20:181-6.
17. Tripathi RC, Casey TA, Wise G. 1974. Hereditary posterior polymorphous dystrophy an ultrastructural and clinical report. *Trans Ophthal Soc U.K.* 94:211-25.
18. Valleix S, Nedelec B, Rigaudiere F, Dighiero P, Pouliquen Y, Renard G, Le Gargasson JF, Delpech M. 2006. H244R VSX1 is associated with selective cone ON bipolar cell dysfunction and macular degeneration in a PPCD family. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(1):48-54.



Cenu za MUDr. Ing. Radka Jirmana, který obsadil v postgraduální sekci – posterové části druhé místo, převzal prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc., jeho školitel.



Třetí místo v sekci postgraduální – postery obsadila MUDr. Petra Lišková.



SEKCE NELEKÁŘSKÁ- OŠETŘOVATELSKÁ VÍTĚZNÉ PRÁCE

VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO SEKCE NELEKÁŘSKÁ – OŠETŘOVATELSKÁ

1. místo: **Mgr. Zuzana Vodehnalová, 2. r.** – Foniatriká klinika 1. LF UK a VFN
Školitel: doc. MUDr. Olga Dlouhá, CSc.
Název práce: „Kvalita života osob s afázií –psychosociální rovina afázií“

2. místo: **Bc. Jana Novotná, 2. r.** – Ústav teorie a praxe ošetrovatelství 1. LF UK
Školitel: **PhDr. Helena Chloubová**
Název práce: „Kvalita života lidí s postupnou ztrátou zraku“

3. místo: **Bc. Jana Holoubková, DiS., 2. r.** – Ústav teorie a praxe ošetrovatelství 1. LF UK
Školitel: PhDr. Helena Chloubová
Název práce: „Centra pro léčbu bolesti“

1. MÍSTO

KVALITA ŽIVOTA OSOB S AFÁZIÍ – PSYCHOSOCIÁLNÍ ROVINA AFÁZIÍ

Autorka: Mgr. Zuzana Vodehnalová, 2. r., Foniatričká klinika 1. LF a VFN

Školitelka: doc. MUDr. Olga Dlouhá, CSc., Foniatričká klinika 1. LF a VFN



Zuzana Vodehnalová

Cílem práce je představit důvody a možnosti měření kvality života u osob s afázií, stejně jako první praktické zkušenosti.

Úvodem stručně o **afázii** samé – jedná se o neurogení narušení komunikační schopnosti, které postihuje v různé míře a v různých kombinacích všechny modalit jazyka, expresi i porozumění. Jde o organickou poruchu, jež vzniká jako důsledek ložiskového poškození mozku v kortikálních i subkortikálních oblastech, které se podílejí na detekci, rozumění řeči, plánování projevu i expresi samé.

V posledním desetiletí se v řadách odborné afaziologické veřejnosti začíná prosazovat **holistický přístup k afázii**, který akcentuje vedle samotného poškození fatických funkcí i **psychosociální důsledky** s afázií spojené. Afázie má pochopitelně negativní dopad na psychické prožívání i sociální schopnosti. **Deprese je přítomná minimálně u 40% osob po CMP - pozitivně korelujícími faktory jsou: přítomnost nonfluentní afázie, předcházející psychiatrická onemocnění, ztráta nebo výrazné omezení autonomie, koexistence jiných neurologických syndromů (Wirocius, Petrissans in Mazaux a kol., 2000). V našich podmínkách se věnoval studiu psychiky osob po CMP Preiss - výsledky jasně prokázaly zvýšenou hladinu depresivity u osob po CMP (Preiss, 1997). Kromě deprese se u osob s afázií můžeme setkat se smutkem, celkovým psychomotorickým zpomalením (vázaným na depresi), častá je nadměrná únava, apatie a úzkost, běžné jsou také poruchy emocionální kontroly a poruchy spánku. Vzácněji se objevují změny osobnosti, nežádka můžeme pozorovat egocentrismus (Wirocius, Petrissans in Mazaux a kol., 2000). Seron řadí mezi nejvýraznější psychické změny osobnosti afatika častější sebestředné jednání, snížení emotivní kontroly, omezení iniciativy, ztrátu schopnosti plánování budoucnosti, změnu v sexuálním chování a obtíže při navazování nových sociálních kontaktů (Seron, 1979).**

Jazykové a komunikační obtíže afatika jsou příčinou kvantitativní změny interakcí mezi jednotlivými členy rodiny. Moderní rodina bude v tomto směru zranitelnější než rodina tradiční, protože její sociální komponenty nejsou neměnné a snížená komunikační schopnost jednoho člena vyvolá její reorganizaci. Dle výzkumu realizovaného autory Niemi a kol. v roce 1988¹ 50% respondentů po CMP označuje své rodinné vztahy jako „zhoršené nebo poškozené“ (North in Mazaux a kol., 2000). Partnerské vztahy jsou zatíženy poruchami interpersonální komunikace, menším sexuálním uspokojením, ztrátou spoluprožívání a úbytkem volnočasových aktivit. Problémy se obvykle manifestují až určitý čas po návratu do domácího prostředí, v době, kdy rodina přestává profitovat z podpory systémové péče o osoby s afázií. Ve vztahu k dětem upozorňuje Ducarne de Ribaucourt (1986) na těžce snášenou ztrátu vlivu a na nepřírozený stav „podřízenosti“ rodičů - afatiků. Naopak děti mohou trpět nedostatkem zájmu rodičů - afatiků způsobeným jejich zvýšenou orientací na vlastní osobu (Seron, 1979). North (in Mazaux a kol., 2000) ve své práci dále upozorňuje na obtížnou společenskou situaci rodiny, která se často dostává do izolace a vlivem mnohých problémů afektivních, materiálních i finančních se postupně vzdává svých volnočasových aktivit a zájmů, jež by mohly být jednou z cest k sociální reintegraci. Izolace celé rodiny afatika je společným tématem mnoha prací. Seron (1979) píše, že mezi trvalými změnami, které jsou výsledkem restrukturalizace rodiny, patří **postupná izolace a ztráta vztahů mimo rodinu samotnou mezi ty nejpodstatnější. Péliissier a kol. (in Herisson, 1993) ve svém výzkumu uvádí, že téměř 3/4 osob s afázií po CMP již nenavázaly žádné nové vztahy. Zbývající 1/4 dotázaných pak navázala nové vztahy převážně se zdravotnickým personálem (s logopedem, fyzioterapeutem).**

V rámci holistického přístupu k afázii se není možné spokojit pouze s lingvistickou diagnostikou fatických funkcí. Povědomí o psychickém prožívání a sociálních důsledcích afázie je důležité nejen pro klinickou diagnostiku a terapii, ale i pro zhodnocení dopadů afázie na kvalitu života. A opačně jen hodnocení kvality života může poskytovatelům terapeutických služeb nabídnout celistvý pohled na problematiku afázie a definovat všechny oblasti, kterým je třeba se v rámci následné péče věnovat.

Kvalita života je velmi vágní pojem užívaný v mnoha oborech – právě pro svou difusnost a snahu vnímat a kvantifikovat život člověka co nejkompexněji je jednotná definice velmi obtížná. Ekonomie a sociologie užívají tzv. objektivní východiska pro hodnocení kvality života, v psychologii a medicíně naopak využíváme východiska subjektivní – kvalita života je pak vnímaná jako soud jednotlivce, jako subjektivní zhodnocení pozice v životě, a to v kontextu kultury a hodnotového systému, ve kterém žijeme, a v souvislosti s osobními cíly, očekávanými a normami. Konkrétně v medicíně je nejčastěji užíván pojem „na zdraví vázaná kvalita života“ (HRQoL). Ten vymezuje tu část kvality života, která je bezprostředně ovlivněná zdravím a je i zdravotnickou péčí ovlivnitelná. Hodnocení kvality života v sobě integruje tři základní dimenze (fyzickou, psychickou a sociální), což plně odpovídá koncepci zdraví tak, jak je definována WHO. Měření kvality života v medicíně se užívá jak experimentálně – pro zhodnocení dopadu toho kterého onemocnění na kvalitu života, tak klinicky – pro zhodnocení efektivity toho kterého terapeutického postupu.

¹ Niemi, M.L. et col.: Quality of life 4 Years After Stroke. Stroke, 1988;19(9):1101 – 1107

Proč měřit kvalitu života u osob s afázií – tedy z hlediska experimentálního - proč mapovat vliv afázie na kvalitu života? Z klinické praxe je zřejmé, že problematika narušené komunikační schopnosti je zatím spíše okrajová, marginalizace otázek spojených s komunikací je patrná nejen ve zdravotnictví, ale i v sociální oblasti (přidělování průkazů ZTP, invalidních důchodů, pomůcek). Alarmující je pak i skutečnost, že roste počet osob, které přežijí cévní mozkovou příhodu (jako dominantní příčinu afázie), stejně jako jejich life expectancy (trvale rostoucí počet hospitalizovaných pro cévní onemocnění mozku², klesající hospitalizační letalita³, obecně dobře známý fenomén stárnutí populace - srovnej např.: Kalvach, 1997⁴). Je tedy třeba začít hledat cesty ke zvýšení kvality jejich života – primárně umět ji zmapovat a měřit. Z hlediska klinického pak je naprosto nezbytné hledat odpověď na klíčovou otázku, zda terapie, kterou našim klientům – pacientům nabízíme, skutečně pozitivně dopadá na kvalitu jejich života – tedy je-li efektivní.

Měření HRQoL u osob s afázií je ovšem výrazně zkomplikováno hned několika faktory, mezi něž bezesporu patří fatická porucha sama, vysoká míra unavitelnosti osob s afázií a časté přidružené deficity. Existuje nespočet obecných i specificky zaměřených nástrojů hodnocení kvality života. Přes pokračující výzkum a nové publikace (srovnej Rev. Neurol. dec. 2004 a oct. 2005) je třeba v souvislosti s cévními mozkovými příhodami (dále jen CMP) zmínit jednak úpravu Sickness Impact Profile (SIP 136)⁵, kterou publikovali v roce 1997 van Straten a kol. jako SA-SIP30⁶, a jednak první pokus o skutečně specificky zaměřený nástroj pro měření kvality života osob po CMP zveřejněný v roce 1999 Williams a kol. jako SS-QOL⁷. Protože právě tyto dvě publikace se staly základem pro výzkumy zaměřené na HRQoL osob s afázií – resp. na možnosti jejího měření. Obě původní práce definovaly vážné poruchy komunikace a/nebo kognitivních funkcí jako kritérium pro vyřazení z projektu a to je také hlavní důvod pro vznik a rozvoj studií zaměřených na problematiku poruch komunikace a měření kvality života. Aktuálně byly publikovány škály v angličtině (SAQOL-39)⁸ i francouzštině (SIP-65)⁹, existuje překlad SAQOL-39 do italštiny¹⁰ a řečtiny.

Hilari a kol. (2001, 2003) studovali a upravili Williamsové škálu tak, aby odpovídala požadavkům práce s osobami s afázií. „Přesto, že byla vyvinuta řada nástrojů pro měření kvality života osob po CMP, většina vyřadila afatiky a osoby s kognitivními poruchami, kteří jsou ve skutečnosti nejvíce ohroženi sociální izolací... test vhodně upravený pro používání u osob s afázií je nezbytný pro klinické výzkumy i hodnocení.“ (Hilari a Byng, 2003, str. 1944) Nejnovější varianta má 39 položek ve 4 základních oblastech (fyzický, psychosociální stav, komunikace a energie – ve smyslu vitality) a testovaná osoba volí na pěti stupňové škále (1 – nemožné – 5 – bez problémů apod.). Test se ukázal se jako spolehlivý a validní nástroj pro měření kvality života osob s chronickou afázií. V závěrečné části autorky upozorňují na to, že použití testu dostupného přímo osobám s afázií může minimalizovat nutnost získávat informace od okolí - ty se mohou od hodnocení afatiků samých výrazně lišit. (Hilari, Byng 2003)

Bénaïm a kol. vycházeli z již zmíněného Sickness Impact Profile, který je standardizován pro francouzský jazyk. Znovu upozorňují na dvě základní překážky, které komplikují hodnocení kvality života u osob s afázií: poruchy porozumění v obou modalitách a snadná unavitelnost, která znemožňuje užití časově náročných dotazníků. Obecné škály se jeví jako příliš dlouhé a jejich jednotlivé položky jako příliš sémanticky i gramaticky komplexní. Proto se autoři rozhodli několikastupňovým procesem zkrátit a zjednodušit SIP. Výsledkem je test o 65 položkách s dichotomickou strukturou odpovědí. Ze studie byli vyloučeni afatici s vážnými poruchami porozumění, přesto autoři stejně jako Hilari a Byng, varují před neuváženým využíváním informací získaných od blízkých či ošetřujících osob. Ty mají tendenci podceňovat kvalitu života. SIP-65 si uchovává metrologické kvality SIP-136 a je plně využitelný v klinické praxi i pro měření efektu terapie (Bénaïm a kol., 2003).

Z výše uvedených úvodů byl na **Foniatrické klinice 1.LF a VFN** zahájen **projekt měření kvality života u osob s afázií**, jehož základní hypotéza zní: Afázie negativně ovlivňuje kvalitu života osoby s afázií, a to minimálně v té míře jako motorické poškození, negativní efekt afázie neustupuje v čase. Dále byl definován soubor faktorů, jejichž vliv na kvalitu života osob s afázií se zkoumá (demografické faktory, doba od vzniku onemocnění, intenzita péče).

Pro realizaci projektu jsme zvolili škálu SIP-65, která má jednoznačně přehlednější strukturu a kterou jsme měli mož-

² 57 622 v r. 1995 proti 65 174 v r. 2002 (ÚZIS – AI ze 14.5. 2004)

³ 16,9 v r. 1997 proti 12,0 v r. 2002 (ÚZIS – AI ze 14.5. 2004)

⁴ Kalvach, Z. a kol.: Úvod do gerontologie a geriatry. Praha: Karolinum, 1997

⁵ SIP – Bergner M.; Bobitt R.A.; Pollard W.E.: The Sickness Impact Profile: validation of a health status measure. Med Care, 1976; 14:57-67

Bergner M.; Bobitt R.A.; Carter W.B.; Gilson B.S.: The Sickness Impact Profile: development and final revision of a health status measure. Med Care, 1981; 19:787-805

⁶ van Straten A.; de Haan R.J.; Limburg M.; Schuling J.; Bossuyt P.M.; van den Bos G.A.: A stroke-adapted 30-item version of the SIP to assess quality of life (SA-SIP30). Stroke, 1997;28(11):2155-2161

⁷ Williams L.S.; Weinberger M.; Harris L.E.; Clark D.O.; Biller J.: Development of a stroke-specific quality of life scale. Stroke, 1999;30:1362-9

⁸ Hilari K.; Byng S.: Measuring quality of life in people with aphasia: the Stroke Specific Quality of Life Scale. Int J Lang Commun Disord, 2001;36(suppl):86-91

Hilari K.; Byng S.; Lamping D.L.; Smith S.C.: Stroke and aphasia quality of life scale-39 (SAQOL-39). Stroke, 2003;34:1944-1950

⁹ Bénaïm, C.; Pellissier, J.; Petiot, S.; Bareil, M.; Ferrat, E.; Royer, E.; Milhau, D.; Herrison, C.: Un outil francophone de mesure de la qualité de vie de l'aphasique: le SIP-65. Ann. Réadapt. Méd. Phys., 2003;46:2-11

¹⁰ Posteraro, L.; Formis, A.; Bidini, C.; Grassi, E.; Curti, M.; Bigli, M.; Agosti, M.; Franceschini, M.: Aphasia quality of life: reliability of the Italian version of SAQOL-39. Eur. Med. Phys., 2004;40:257-62



nost ověřit v původním jazykovém prostředí. Ve spolupráci s lingvisty z FF UK byl původní dotazník přeložen – metodou dvojitého překladu a lingvistické komparace původní a dvakrát přeložené varianty. Aktuálně bylo dotazování podrobeno 75 osob (49 osob s afázií a 26 osob po CMP bez afázie), další měření proběhne v září tohoto roku. V říjnu bude odborná foniatrická a logopedická veřejnost informována o předběžných výsledcích. Celkem by mělo být do výzkumu zařazeno minimálně 100 osob s afázií a 100 osob v kontrolní skupině.

Závěrem: „Vyšší míra utrpení, omezená aktivita, vyšší míra narušené komunikační schopnosti a komorbidity jsou prediktory horší kvality života osob s chronickou afázií po CMP. Je třeba, aby to poskytovatelé zdravotních služeb vzali v úvahu...“¹¹

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) BENAÏM, C.; PELLISIER, J.; PETIOT, S.; BAREIL, M.; FERRAT, E.; ROYER, E.; MILHAU, D.; HERRISON, C.: Un outil francophone de mesure de la qualité de vie de l'aphasique: le SIP-65. *Ann. Réadapt. Méd. Phys.*, 2003;46:2-11.
- 2) DELOCHE, G. a kol.: Le handicap des adultes cérébrolésés: dimensions et déterminants statistiques. In: *Journée scientifique de l'École d'Orthophonie de Lyon. École d'orthophonie de Lyon, vlastním nákladem*, 1996.
- 3) DUCARNE DE RIBAUCCOURT, B.: Rééducation sémiologique de l'aphasie. Paris, NY: MASSON, 1986.
- 4) HERISSON, C.; SIMON, L.: Evaluation de la qualité de vie. Paris: Masson, 1993.
- 5) HILARI, K.; BYNG, S.; LAMPING, D.L.; SMITH, S.C.: Stroke and Aphasia Quality of Life Scale-39 (SAQOL-39) Evaluation of Acceptability, Reliability, and Validity. *Stroke*, 2003;34:1944-1950.
- 6) MAZAUX, J.M.; MOLY, P.; GIROIRE, J.M. aj.: Approches psychologiques et sociales. In: MAZAUX, J.-M.; BRUN, V.; PELISSIER, J.: *Aphasie – Rééducation et réadaptation des aphasies vasculaires*. Paris: MASSON, 2000, 2001.
- 7) NORTH, P.: Vie familiale, le conjoint, la souffrance de l'aidant, les loisirs. In: MAZAUX, J.-M.; BRUN, V.; PELISSIER, J.: *Aphasie – Rééducation et réadaptation des aphasies vasculaires*. Paris: MASSON, 2000, 2001.
- 8) POSTERARO, L.; FORMIS, A.; BIDINI, C.; GRASSI, E.; CURTI, M.; BIGHI, M.; AGOSTI, M.; FRANCESCHINI, M.: Aphasia quality of life: reliability of the Italian version of SAQOL-39. *Eur. Med. Phys.*, 2004;40:257-62.
- 9) PELISSIER, J.; BEHAIM, C.; ENJALBERT, M.; BRUN, V.: Qualité de vie et aphasie: enjeu d'une mesure. In: MAZAUX, J.-M.; BRUN, V.; PELISSIER, J.: *Aphasie – Rééducation et réadaptation des aphasies vasculaires*. Paris: MASSON, 2000, 2001.
- 10) PELISSIER, J.; ENJALBERT, M.; PAPIN-SAITOT, C.; THEBAULT-FORCELLINI, C.; PERAY, P.; BLARD, J.M.: Qualité de vie et handicap de communication de l'adulte aphasique. In: HERISSON, C.; SIMON, L.: *Evaluation de la qualité de vie*. Paris: Masson, 1993.
- 11) PONZIO, J.; LAFOND, D.; DEGIOVANI, R.; JOANETTE, Y.: *L'Aphasique*. Québec: Edisem, 1991.
- 12) PREISS, M.: Psychologické aspekty pacientů několik let po cévní mozkové příhodě. *Československá psychologie*, 1997, č.5, S.436-445.
- 13) SERON, X.: *Aphasie et neuropsychologie*. Bruxelles: Mardaga, 1979.
- 14) van STRATEN, A.; de HAAN, R.N.; LIMBURG, M.; SCHULING, J.; BOSSUYT, P.M.; van den BOS, G.A.M.: A stroke-adapted 30-item version of the SIP to assess quality of life (SA-SIP30). *Stroke*, 1997;28(11):2155-2161.
- 15) WILIAMS, L.S.; WEINBERGER, M.; HARRIS, L.M.; CLARK, D.O.; BILLER, J.: Development of a Stroke-Specific Quality of life Scale. *Stroke*, 1999;30:1362-1369.
- 16) WIROTIUS, J.M.; PETRISSANS, J.L.: Troubles psychologiques et dépression chez la personne aphasique. In: MAZAUX, J.-M.; BRUN, V.; PELISSIER, J.: *Aphasie – Rééducation et réadaptation des aphasies vasculaires*. Paris: MASSON, 2000, 2001.

¹¹ Hilari, K. a kol.: Predictors of health-related quality of life in people with chronic aphasia, *Aphasiology*, 2003

2. MÍSTO

KVALITA ŽIVOTA U LIDÍ S POSTUPNOU ZTRÁTOU ZRAKU

Autorka: Bc. Jana Novotná, 2. r.

Školitelka: PhDr. Helena Chloubová, Ústav teorie a praxe ošetřovatelství 1. LF UK



Jana Novotná

Tato práce se zabývá problematikou lidí postižených vadou zraku. Jejich částečná nebo úplná ztráta schopnosti vizuálně se orientovat v našem světě s sebou nese nejrůznější obtíže, s nimiž se zejména staří lidé velmi obtížně vyrovnávají. Někteří z nich se zhoršila kvalita života, nedokázali se s postupným úbytkem zraku vyrovnat či se uzavřeli před okolím. Setkala jsem se i s lidmi, kteří „skrže svůj osud“ nedokázali nalézt cestu a nový způsob života a zůstali ve svém světě uzavření. Výzkum sleduje proces vyrovnání se lidí s postupně se zhoršujícím zrakem. Mimo jiné napovídá, co všechno je potřeba učinit, zlepšit, vybudovat pro lidi trpící zrakovým handicapem, aby se v budoucnu nestávalo, že zůstanou sami bez pomoci a naděje cesty ven z jejich „temnoty“.

Odpovědi na otázky jsem hledala v tříkolovém výzkumu, kde jsem oslovila celkem 32 lidí s nejrůznějšími vadami zraku. Pro lepší přehlednost v rámci vyhodnocení a interpretace získaných údajů jsem je rozdělila do dvou skupin, respondenty oslovené v nemocničním prostředí a respondenty oslovené v rekvalifikačním centru (dále jen RC). Jak se později ukázalo, skupina respondentů oslovených v nemocničním prostředí (dále jen NP) byla vyhodnocena jako „riziková“. Jako skupina lidí, se kterými je potřeba spolupracovat a podávat jim pomocnou „ruku“ i mimo zdi nemocničních zařízení.

Mezi nejzajímavější výstupy výzkumu hodnocení kvantitativní metodou jsem zařadila tyto: Respondenti oslovení (NP) se adaptovali na postupnou ztrátu zraku velmi obtížně. 8 respondentů v NP v druhém kole odmítlo další spolupráci. Domnívám se, že tím odmítají i přijetí zrakové vady. 25% z nich doufalo, že se jejich zraklepší, nechtěli si připustit, že mají nějaké problémy. 2 z nich uváděli únikové myšlenky (smrt). S tříměsíčními odstupy jsem zaznamenávala u respondentů nejrůznější stádia smířování se s onemocněním. 22% respondentů NP připustilo, že mají problémy vyrovnat se s postižením zraku. 9% respondentů se snažilo brát vadu zraku jako součást svého života. Zbytek respondentů NP popírá obtíže, bagatelizuje své problémy a odmítá pomoc svých blízkých. 31% respondentů považovalo za nejtěžší ve svém životě smrt blízké osoby. 25% respondentů přiznává, že pro ně je nejtěživější jejich vlastní postižení zraku. 41% respondentů je schopno vyrovnat se s postupnou ztrátou zraku díky podpoře blízkých osob. Respondenti RC raději řeší své problémy sami. 66% všech respondentů popisuje největší problémy s orientací v cizím prostředí, čtení a domácími pracemi. 64% oslovených respondentů nepoužívá žádnou kompenzační pomůcku určenou lidem se zrakovým postižením. Pouze 36% respondentů z celkového počtu jsou členy organizací pro zrakově postižené. V oblasti integrace zrakově postižených do „běžné“ společnosti jsem zaznamenala rozpory ve výpovědích. 72% respondentů si myslí, že se vztahy s jejich blízkými nezměnily, na druhou stranu 50% avšak neví, co si jejich blízcí o nich myslí a 50% respondentů pociťuje, že jsou přijímáni negativně. 59% respondentů považuje za nejvyšší hodnotu „zdraví“. Pouze 2 respondenti připouští, že se jejich žebříček hodnot od onemocnění zraku změnil. 72% respondentů je spokojeno se svým životem, naproti tomu 59% respondentů připouští, že si nepředstavovali prožít svůj život tímto způsobem.

Na základě zjištěných informací jsem vypracovala postup možností zlepšení kvality života u lidí s postupnou ztrátou zraku. Tímto postupem by se do budoucna měly řídit sestry v pozicích supervizek, které by měly na starosti tyto následující činnosti: na základě odebrané ošetřovatelské anamnézy, by vyhodnotily rizikové pacienty, kteří by se dále sdružovali do skupin, dále by tyto supervizorky poskytovaly individuální nebo skupinovou psychosociální podporu a motivační sezení. Skupinová setkání by mohla mít i charakter informativní. Velmi důležitá je také mezioborová spolupráce a kontinuita této spolupráce. Zjistila jsem, že jsou lidem s postižením zraku velmi často předkládány neúplné informace, se kterými si neumějí poradit. Práce očních lékařů a sester pracujících v nemocničním prostředí nenavazuje na práci jiných odborníků v oblasti problematiky práce s lidmi se zrakovými postiženími. Proto je nutné vypracovat databázi nejrůznějších odborníků, ale i firem, které nabízí pomůcky pro lidi se zrakovým postižením a organizací se stejným zaměřením. Za velmi důležité považuji to, jakým způsobem se informace ke zrakově postiženým dostávají. V čekárnách jsou často k dispozici nejrůznější informační nebo reklamní letáčky a prospekty, které si však člověk s těžkou vadou zraku nepřečte. Proto navrhuji, aby v takovýchto čekárnách byly umístěny přehrávače s audionahrávkami, které informují např. o možnosti léčby určitých oftalmologických diagnóz, rehabilitaci zraku, kompenzačních a rehabilitačních pomůckách, kontaktech na organizace pro zrakově handicapované atd.

3. MÍSTO

CENTRA PRO LÉČBU BOLESTI

Autorka: Bc. Jana Holoubková, DiS., 2. r.

Školitelka: PhDr. Helena Chloubová, Ústav teorie a praxe ošetrovatelství, 1. LF UK



Jana Holoubková

ÚVOD

Bolest je stará jako lidstvo samo a téměř každý se sní v životě setkává. Je nejčastější příčinou, která přivádí nemocné lékaři. Často signalizuje, že není s naším organismem něco v pořádku nebo se něco děje v psychosociálním či emocionálním okolí člověka.

Bolest má základní pozitivní obrannou a signální funkci organismu.

Upozorňuje nás na poškození našeho těla, omezuje další namáhání a přetěžování. V určitých případech má bolest negativní význam, může stát vlastní nemocí, přináší nadbytečné utrpení vedoucí k rozvolnění rodinných a sociálních vazeb a ve svých důsledcích až ke změnám osobnosti. Jedná se především o ty případy, kdy intenzivní bolest je hlavním příznakem onemocnění a nebo kdy její délka trvání a intenzita často ani neodpovídají příčině a míře poškození, jedná se o chronickou bolest. Zejména chronickou bolestí se v posledních letech zabývají Centra pro léčbu bolesti, která pomáhají nemocným trpícím chronickou bolestí tuto strast léčit a přistupují k ní individuálně, komplexně a multidisciplinárně. S podobnou myšlenkou pracoval již mladý anesteziolog John J. Bonica, který byl pověřen péčí o nemocné s bolestí v Madiganské vojenské nemocnici ve státě Washington v roce 1944. Případy, se kterými si nevěděl rady, posílal na konzultace k různým specialistům a poté s nimi o svých pacientech diskutoval. Úspěch vzájemné výměny informací ho inspiroval k založení multidisciplinární poradny pro léčbu bolesti ve Všeobecné nemocnici v Takomě v roce 1947. V roce 1973 zorganizoval setkání asi 300 vědců zabývajících se výzkumem bolesti v Seattlu, kde získal jednomyslný souhlas k založení Mezinárodní společnosti pro studium bolesti. Její první prezidentkou se stala Denise Allbe-Fessard. Dnes má tato společnost 55 národních sekcí ze 6 kontinentů a přes 6700 členů, kteří se scházejí každé 3 roky na Světovém kongresu o bolesti. Historie léčby bolesti v ČR je spojena s anesteziologem Dimitrijem Miloschewským a jím založenou komisí pro studium a léčbu bolesti při Společnosti anesteziologie a resuscitace České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně v roce 1974. Ve specializačních kurzech z anesteziologie a resuscitace přednášel problematiku bolesti již začátkem sedmdesátých let. V roce 1977 otevírá spolu s neurofyziologem Ladislavem Vyklickým a neurochirurgem Karlem Šourkem první ambulanci léčby bolesti ve Fakultní nemocnici Na Bulovce v Praze. V roce 1984 byl přerovský anesteziolog Jaroslav Štimpl pověřen založením druhé ambulance léčby bolesti u nás. Avšak až změna totalitních poměrů po roce 1989 umožnila, aby vznikla samostatná Společnost pro studium a léčbu bolesti. Prvním předsedou se stal primář rehabilitačního oddělení nemocnice v Praze 9 František Neradilek. V té době se v Praze již prováděla léčba bolesti. Teprve však v roce 1992 vznikl Metodický pokyn pro budování pracovišť léčby bolesti Ministerstva zdravotnictví České Republiky, který umožnil vybudovat během následujících 3 let síť pracovišť po celé republice. Téma této práce jsem si nevybrala náhodou. Již šestým rokem pracuji na Anesteziologicko-resuscitační klinice ve FN v Plzni, kde je její součástí i Centrum léčby bolesti I. kategorie (nejvyššího typu). Při své práci jsem si uvědomila, že práce sestry je spojena i s tím, že se setkává s bolestí a utrpením druhých. Životním posláním zdravotní sestry by mělo být i tuto bolest a utrpení mírnit a být nemocným v nejtěžších chvílích na blízku. I přes obrovský pokrok, který medicína zaznamenala v posledních letech, je stále problematika bolesti podceňována. Nemůžeme se spokojit s tím, že bolest neodmyslitelně patří k životu. V dnešní době již existuje mnoho možností, jak tlumit neztížitelnou nebo dlouhotrvající bolest. Tyto možnosti musíme najít a využít a zabránit tomu, aby nemocný zbytečně trpěl, proto se v diplomové práci věnuji pracovištím léčby bolesti.

METODY

Předmětem výzkumu bylo zhodnocení rozložení a popis hlavních funkcí Center léčby bolesti (CLB) v celé České Republice. Stanovila jsem si 6 hypotéz a k nim 6 relevantních cílů. Jako základní metoda kvantitativního neexperimentálního výzkumu jsem zvolila dotazníkové šetření. Dotazníky byly rozeslány do všech akreditovaných pracovišť léčby bolesti, které byly zaregistrovány do 31. prosince roku 2006. Výzkum spočívající v dotazníkovém šetření byl anonymní a obsahoval 18 otázek a byl také rozdělen do více částí. Jeho díly odpovídaly daným cílům a hypotézám. Pro zajištění výpovědní hodnoty byl proveden předvýzkum u 2 zaměstnanců pracujících v CLB v Plzni. Jednalo se o zdravotní sestru a o staniční sestru. Dotazník se skládal z otázek uzavřených, polouzavřených a otevřených. Dále dotazník obsahoval otázky samostatné a škálovací. Kromě otázek zaměřených na vlastní výzkum bylo zvoleno i několik otázek pomocných (identifikační a kontrolní) a byl dán prostor na náměty, připomínky a vlastní vyjádření k tomuto tématu. K hodnocení dotazníků bylo využito metod třídění dat a popisných statistických charakteristik. Toto šetření bylo doplněno o studium dokumentace v CLB v Plzni. Vybrala jsem 3 nejčastější ošetrovatelské kazuistiky, které jsou typické a velmi časté v léčbě chronické bolesti. Kritériem pro výběr Center a pracovišť léčby bolesti byla jejich platná akreditace Ministerstvem zdravotnictví české republiky. Do výzkumu bylo zahrnuto 53 CLB různých typů, která byla garantována Společností pro studium a léčbu bolesti. SSLB je zástitou pro jednotlivá pracoviště léčby bolesti a vydává pro jednotlivá pracoviště „Osvědčení“ na podkladě absolvování kurzu „Multidisciplinární léčby bolesti“ a odborných stáží na vybraných pracovištích. Na doporučení regionálního odborníka SSLB a po schválení výborem SSLB vydává „Garanci“, která slouží k jednání se zdravotními pojišťovkami. Regionální odborníci jsou členové výboru SSLB a jsou odpovědní za kvalitu pracovišť ve svém regionu

(krají), provádějí jejich kontrolu a pomáhají v činnosti a při řešení problémů příslušných pracovišť léčby bolesti. Celkem se tedy jednalo o 53 CLB v celé České Republice, mezi která patřila zařízení I. – IV. kategorie státního i soukromého typu. Oslovenými zaměstnanci byly zdravotničtí pracovníci vykonávající nelékařské zdravotnické povolání, tedy vrchní sestry, staniční a zdravotní sestry, které v daných CLB pracují. V tomto případě se jednalo pouze o ženy. Ve své práci jsem tedy zkoumala samotná CLB, zdravotní sestry, které zde pracují a klienty, kteří tato pracoviště navštěvují.

VÝSLEDKY

Bylo zjištěno, že v každém kraji ČR fungují alespoň 2 pracoviště, která se specializují na léčbu bolesti, na 100 tisíc obyvatel připadá asi 1 CLB. Hustota CLB většinou odpovídá hustotě obyvatel v jednotlivých krajích. Nejvíce pracovišť se nachází v Praze a Moravskoslezském kraji. Dále bylo zjištěno, že nevhodný životní styl je ve většině případů příčinou chronické bolesti. Mezi nejčastější faktory nezdravého životního stylu patřil nedostatek pohybu a s ním související obezita. Byl také patrný stálý nárůst klientely CLB, kdy od roku 2002 vzrostl počet nemocných přibližně o 21 000. Věková hranice klientů s bolestí se stále rozšiřuje, pohybuje se v rozmezí 1–103 roku, nejčastější skupinou jsou pacienti v důchodovém věku a ženy trpí chronickou bolestí více než muži. Dále CLB navštěvují nejvíce lidé s neoncologickými diagnózami (převažuje vertebrogenní algický syndrom ve všech krajích ČR) a bolestí trpí nejvíce lidé v invalidním nebo starobním důchodu. Mezi nejčastější metody tlumení chronické bolesti patří kombinace invazivních a neinvazivních technik, z nichž převládají farmakoterapie a kaudální bloky. Největším problémem CLB zůstávají finanční limity pojišťoven a finanční situace vůbec, která je mnohdy pro některá (zejména soukromá) pracoviště existenčně důležitá.

ZÁVĚR

Chronická bolest je stále problémem a je často zlehčována. Svou práci jsem chtěla upozornit na opomíjený fakt ze stran lékařů, ale i zdravotních sester. Zejména lékaři cítí u nemocných, kteří jsou v jejich očích vyléčeni, ale přesto trpí bolestí, své selhání a neúspěch. Chronická bolest není jen záležitostí fyzickou, nýbrž také psycho-sociální. Ať už se jedná o ambulance nebo lůžkové části jednotlivých medicínských oborů, vždy bychom měli nemocného ujistit, že mu dokážeme od jeho bolesti pomoci, nebo alespoň víme o zařízení, kde jeho trápení s bolestí mohou vyřešit specializovaní odborníci. Neznamená to ovšem zavírat před problémy nemocných oči a přehazovat si je mezi specialisty jako horký brambor. Péče o tlumení a odstraňování bolesti musí být tedy v souladu se zajištěním péče o potřeby nemocných. Důležitá je týmová práce a to nejen lékaře a sestry, ale vzájemná multidisciplinární spolupráce, kde hlavní roli hraje pacient. CLB jsou tedy neodmyslitelnou složkou komplexní péče o nemocné trpící chronickou bolestí, protože být bez bolesti je pro každého z nás naprosto přirozené, tak se učme tuto přirozenost podporovat a udržovat.



První místo v sekci nelékařské – ošetřovatelské obsadila Mgr. Zuzana Vodehnalová.



ZVLÁŠTNÍ CENA

Cena nakladatelství Galén s.r.o.

Autor: **Jakub Minks, 5. r.** – Ústav dědičných a metabolických poruch 1. LF UK a VFN

Školitel: MUDr. I. Šebesta a MUDr. M. Hřebíček

Název práce: „Vyšetření zešíkmení inaktivace chromosomu X u žen“

Cena Medical Tribune

Autor: **Jan Beneš, 5. r.** – Fyziologický ústav 1. LF UK

Školitel: **doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.**

Název práce: „Signalizační změny u laboratorní myši vyvolané řazením genu c-fos“

Cena Zdravotnických novin

Autorky: **Renáta Bartáková a Kateřina Matějů, 4. r.** – II. interní klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN

Školitel: MUDr. Roman Škulec

Název práce: „Průzkum používání mírné hypotermie u pacientů po srdeční zástavě na území ČR“



Renáta Bartáková a Kateřina Matějí převzaly zvláštní cenu Zdravotnických novin.



Bc. Jana Holoubková, DiS., se umístila na 3. místě v sekci nelékařské-ošetřovatelské.



Cenu Medical Tribune předal Janu Benešovi šéfredaktor Medical Tribune Mgr. Jaroslav Hořejší.



Ředitel Nakladatelství Galén, s.r.o. při předávání ceny nakladatelství Jakubu Minksovi.



Sponzoři 8. ročníku SVK na 1. LF UK – zleva Mgr. Markéta Mikšová (šéfredaktorka Zdravotnických novin), PhDr. Lubomír Houdek (ředitel nakladatelství Galén, s.r.o.), Mgr. Jaroslav Hořejší (šéfredaktor Medical Tribune).



Šéfredaktorka Zdravotnických novin Mgr. Markéta Mikšová dlouhodobě spolupracuje s 1. lékařskou fakultou UK při pořádání studentských vědeckých konferencí.



Zpracovalo Oddělení vnějších vztahů 1. LF UK

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 Mgr. Karel Meister

Sazba Kateřina Dvořáková, Galén

Tisk GLOS, Špidlenova 436, 513 01 Semily

ISBN 978-80-7262-520-8

2007



H
A