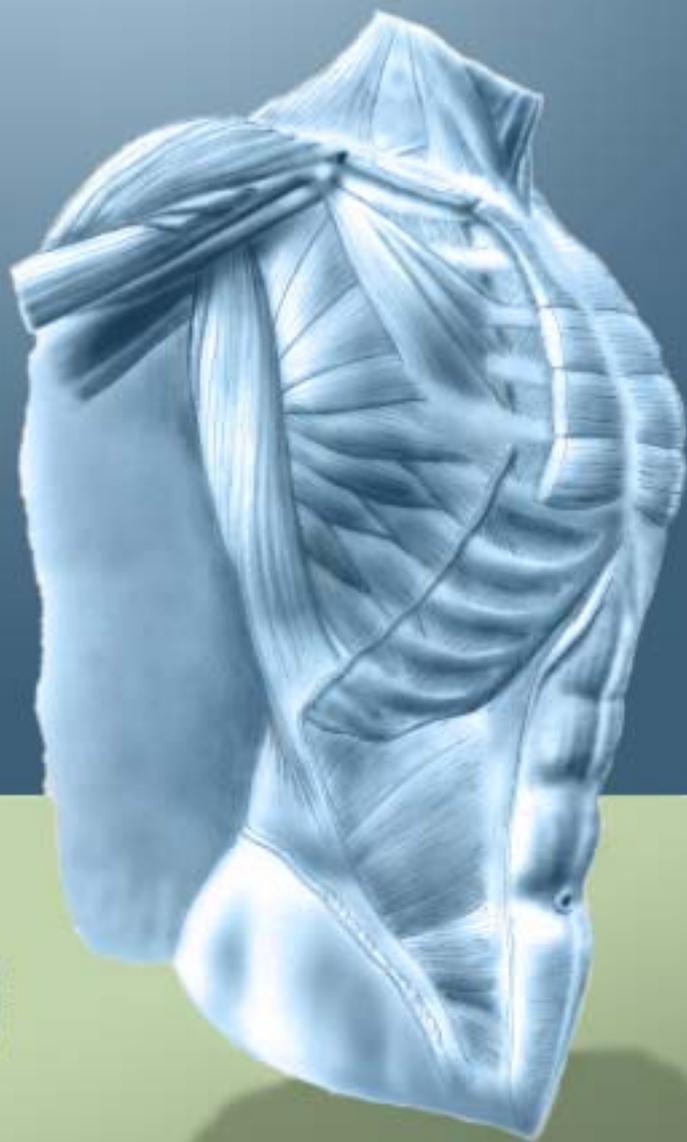


4. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Konaná dne 19. května 2003
pod záštitou děkana 1. LF
prof. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc.

4. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Konaná dne 19. května 2003 pod záštitou děkana 1. LF
prof. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc.

Slovo úvodem	3
Pozvánka	4
Seznam účastníků 4. studentské konference 1. lékařské fakulty	5
Hodnotitelské komise 4. studentské vědecké konference 1. LF konané dne 19. 5. 2003	6
Abstrakta prací účastníků	7
Sekce pregraduální - teoretická část	8
Sekce pregraduální - klinická část	18
Sekce postgraduální - přednášky	26
Sekce postgraduální - postery	40
VÍTĚZNÉ PRÁCE - in extenso	47
Sekce pregraduální - teoretická část	48
Pavel Říha - The transfer of mutant Cd36 gene from SHR/Ola, spontaneously hypertensive rat, onto genetic background of PD/Cub strain, model of metabolic syndrome X	49
Jiří Šedý - Nadměrná exprese neurotofínu-3 ve svalech myši s vyřazeným genem Er81 zachrání axonální projekce proprioceptivních neuronů k motoneuronům	54
Tereza Pelichovská - Effect of total body irradiation dose together with proper Tininy between cyclophosphamide and irradiation on engraftment of donor cells in experimental murine model of bone marrow transplantation	58
Sekce pregraduální - klinická část	62
Jiří Šedý - Klinická anatomie příštítných žláz	63
Zdenka Vaňková - Diagnostický význam stanovení protilátek proti á-fodrinu	67
Daniela Fornůsková, M. Tesařová, P. Ješina, A. Vojtíšková, H. Hansíková, J. Houštěk - Biochemical expression of mtDNA mutation 9205delTA in ATP6 gene	73
David Zogala, A. Hořínek, Z. Lacinová, M. Hampf, R. Bernhardt, B. Štrauch, T. Zelinka, J. Widimský - Prevalence familiárního hyperaldosteronismu typu I. v České Republice	77
Sekce postgraduální - přednášky	82
Radek Malík, Petr Bušek, Vladislav Mareš, Jan Ševčík, Zdeněk Kleibl and Aleksi Šedo - Dipeptidyl Peptidase-IV Activity and/or Structure Homologues (DASH) in Transformed Neuroectodermal Cells	83
T. Honzik, P. Chrastina, H. Hansikova, M. Elleder and J. Zeman - Carnitine profile during foetal and early postnatal period	87
Mgr. Kateřina Zídková - Detekce variability v regulačních oblastech genu pro apo(a)	91
Sekce postgraduální - postery	96
Vilma Habrdová - Comparison of Codeine Levels in Saliva and Serum after an Oral Codeine Administration	97
Ing. Eliška Krejčí, MUDr. Pavel Šnajdr - Expres transkripčního faktoru c-Myb v kuřecím embryu a jeho role ve vývoji neurální lišty	98
Jiří Brabec - Změny objemů striata v závislosti na věku a jejich predikce za použití jednoduchého měření	99
Zvláštní cena Zdravotnických novin	102
Jaromír Křemen - Opomíjené aspekty rizikového chování	103

Fakultní studentské vědecké konference se stávají již novou tradicí. Dne 19. května 2003 proběhla na 1. lékařské fakultě již čtvrtá obnovená studentská vědecká konference. Studenti soutěžili ve 4 kategoriích pregraduální-teoretické, pregraduální-klinické, postgraduální přednáškové a postgraduální posterové. V každé ze sekcí soutěžil dostatečný počet prací nejméně 12 a nejvíce 24. To umožnilo porotám adekvátně práce ohodnotit a rozdělit finanční odměnu těm, kdo se umístili na prvních 3 místech. Zdravotnické noviny udělily navíc samostatnou cenu jedné z prací. Účastníci dostali také věcné ceny od nakladatelství Galén a Grada.

Ceny jsme tradičně studentům udělili před Vědeckou radou 1. LF dne 27.5. 2003. Vedení fakulty si váží zejména všech pregraduálních studentů, kteří při náročném studiu dokážou najít čas pro vědu. Pracoviště fakulty tak mohou z jejich řad vybírat vhodné adepty pro postgraduální studium. Studentská vědecká konference je vhodnou příležitostí pro postgraduální studenty nižších ročníků, kteří mají možnost vyzkoušet si prezentaci svých prvních výsledků. Prakticky všichni učitelé fakulty začínali svou vědeckou dráhu na studentských vědeckých konferencích. Je tedy snad oprávněná naděje, že mezi těmi, jejichž práce jsme letos slyšeli, jsou ti, kdo se stanou významnými osobnostmi naší fakulty v příštích desetiletích.

Děkuji proděkanovi pro vědeckou práci a výzkum profesoru Vladimíru Tesařovi, pracovníkům oddělení vědy a paní magistře Vlastě Helekalové za pomoc při organizaci konference a editaci sborníku konference. Děkuji také a sponzorům – firmě Johnson & Johnson, nakladatelství Galén s.r.o. a Grada Publishing spol. s r.o. a Zdravotnickým novinám za podporu konference.

Blahopřeji všem, kdo zvítězili, děkuji všem, kdo se zúčastnili a přeji hodně úspěchů těm, kdo postoupili do celostátního kola studentské vědecké konference.

*prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
děkan fakulty*



Děkan 1. LF profesor Štěpán Svačina předává ceny vítězům

4. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

1. lékařské fakulty

konaná pod záštitou děkana 1. LF
prof. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc.

19. KVĚTNA 2003

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

*4. studentskou vědeckou konferenci zahájí děkan 1. lékařské fakulty
prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc. dne 19. 5. 2003 v 8.00 hodin
v zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2.*

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

Sekce pregraduálních prací bude probíhat 19. května 2003, a to:

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

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

Sekce postgraduálních prací bude probíhat 19. května 2003 od 8.15 hodin v zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2

(prezentace proběhne na základě hodnocení komise formou přednášky nebo posteru)

Práce mohou být prezentovány v českém i anglickém jazyce. Doba přednášky bude maximálně 10 minut a prostor pro diskusi 5 minut. K dispozici bude dataprojektor, zpětný projektor a diaprojektor s možností dvojprojekce a postery (rozměr 160x120 cm).

Účastníky konference žádáme, aby si přinesli svůj osobní notebook.

K pozvánce je přiložen časový harmonogram jednotlivých vystoupení.

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

prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
děkan 1. LF

Veškeré informace o konání SVK:
Oddělení pro vědeckou činnost
a zahraniční styky 1. LF
Tatiana Králová, tel. 224964358
e-mail: tkral@lf1.cuni.cz

SEKCE PREGRADUÁLNÍ
- TEORETICKÁ ČÁST

- 1. Brantová Olga, 4.r.
- 2. Hejčl Aleš, 6.r.
- 3. Klein Martin, 3.r.
- 4. Manger Martin, 4.r.
- 5. Neprašová Helena, 5.r.
- 6. Orlický Michal, 3.r.
- 7. Pelichovská Tereza, 6.r.
- 8. Pethö Roman, 2.r.
- 9. Poláček Hubert, 5.r.
- 10. Pražák Josef, 4.r.
- 11. Riljak Vladimír, 5.r.
- 12. Říha Pavel, 3.r.
- 13. Strnadová Hana, 6.r.
- 14. Šedý Jiří, 5.r.
- 15. Teplický Marian, 3.r.
- 16. Zápotocký Michal, 5.r.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ
- KLINICKÁ ČÁST

- 1. Fornůsková Daniela, 4.r., PĚF UK
- 2. Bajerová Jana, 5.r., PĚF UK
- 3. Havránek Štěpán, 5.r.
- 4. Hippman Radek, 3.r.
- 5. Kovařík Aleš, 5.r.
- 6. Křemen Jaromír, 5.r.
- 7. Pantelakis Linos, 6.r.
- 8. Rašlová Nina, 5.r., PĚF UK
- 9. Stebel Jakub, 3.r.
- 10. Šedý Jiří, 5.r.
- 11. Vaňková Zdenka, 5.r.
- 12. Votavová Hana, 6.r.
- 13. Zimová Kamila, 5.r.
- 14. Zogala David, 5.r.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ
- PŘEDNÁŠKY

- 1. Beran Ondřej, MUDr.
- 2. Canová Nikolína, MUDr.
- 3. Halaška Michael, MUDr.
- 4. Honzík Tomáš, MUDr.
- 5. Chovanec Martin, MUDr.
- 6. Janatová Markéta, Mgr.
- 7. Krátká Zuzana, Mgr.
- 8. Krausová Klára, Mgr.
- 9. Lenčová Erika, MUDr.
- 10. Linková Lucie, MUDr.
- 11. Malík Radek, MUDr.
- 12. Mikšovský Martin, MUDr.
- 13. Podzimek Štěpán, MUDr.
- 14. Radhous Ivo, MUDr.
- 15. Řasová Kamila, Mgr. PhDr.
- 16. Trnečková Lenka, Mgr.
- 17. Válek Martin, MUDr.
- 18. Veselá Kateřina, Ing.
- 19. Wittner Michal, Mgr., MUDr.
- 20. Záhoráková Daniela, Mgr.
- 21. Zakiyanov Oskar, MUDr.
- 22. Zanvit Petr, Mgr.
- 23. Zídková Kateřina, Mgr.
- 24. Zikán Michal, MUDr.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ
- POSTERY

- 1. Benešová Petra, MUDr.
- 2. Böhm Marek, MUDr.
- 3. Brabec Jiří, RNDr.
- 4. Dušková Michaela, MUDr.
- 5. Fořtová Magdalena, Ing.
- 6. Habrdová Vilma, Mgr.
- 7. Charalampidi Chanum, MUDr.
- 8. Kemling David, MUDr.
- 9. Klempíř Jiří, MUDr.
- 10. Krejčí Eliška, Ing.
- 11. Kučera Tomáš, MUDr.
- 12. Mohamed Ahmed G. , MUDr.
- 13. Šuchmová Martina, Mgr.

HODNOTITELSKÉ KOMISE 4. STUDENTSKÉ VĚDECKÉ KONFERENCE 1. LF KONANÉ DNE 19. 5. 2003

SEKCE PREGRADUÁLNÍ

TEORETICKÁ ČÁST

Předseda: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.
Členové: prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.
prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc.
doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.

KLINICKÁ ČÁST

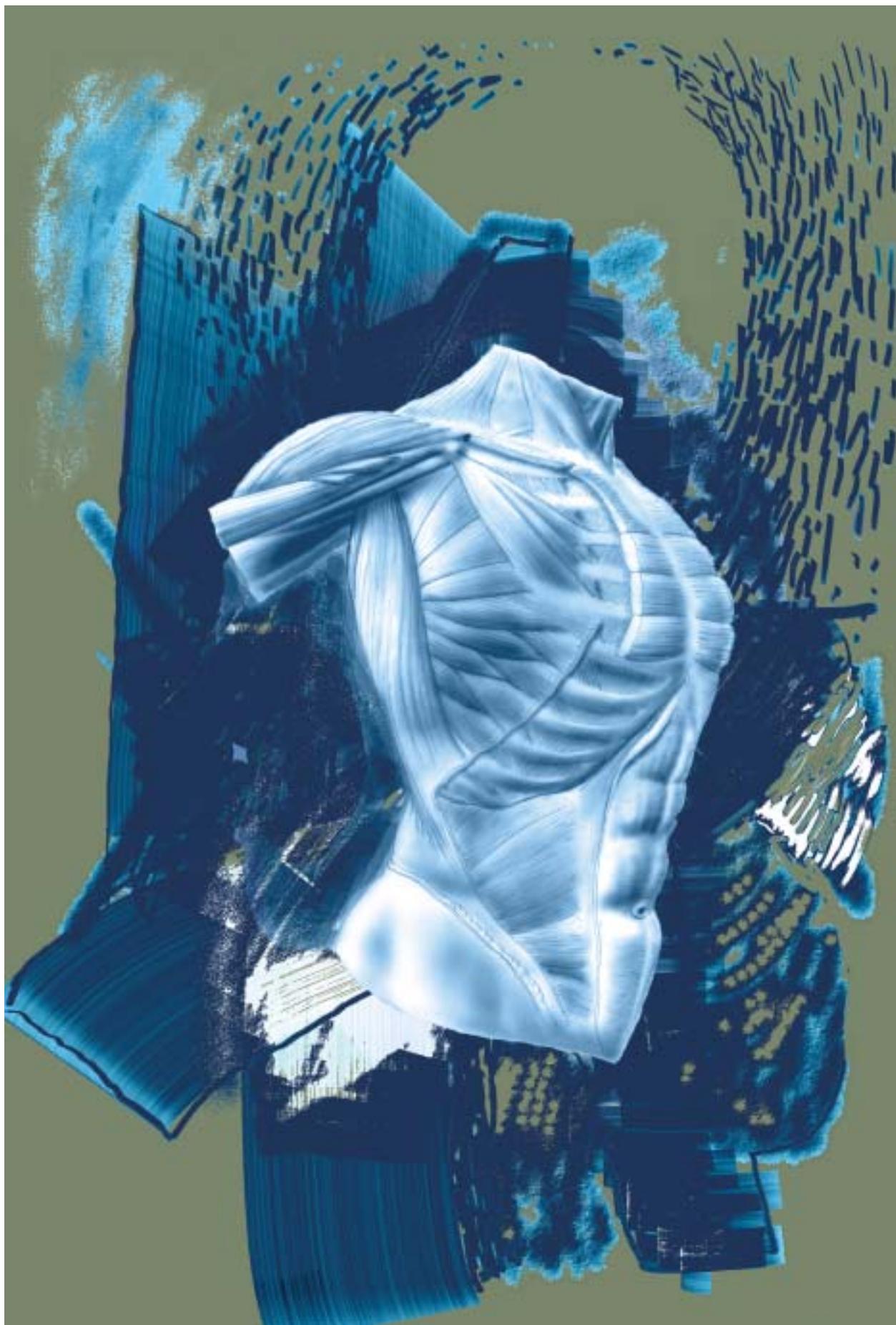
Předseda: prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.
Člen: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ

Předseda: prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
Členové: prof. RNDr. František Vítek, DrSc.
doc. MUDr. Drahomíra Křenová, Csc



Prezentace prací 4. studentské vědecké konference



SEKCE PREGRADUÁLNÍ - TEORETICKÁ ČÁST

- 1. Brantová Olga, 4.r.
- 2. Hejčl Aleš, 6.r.
- 3. Klein Martin, 3.r.
- 4. Manger Martin, 4.r.
- 5. Neprašová Helena, 5.r.
- 6. Orlický Michal, 3.r.
- 7. Pelichovská Tereza, 6.r.
- 8. Pethö Roman, 2.r.
- 9. Poláček Hubert, 5.r.
- 10. Pražák Josef, 4.r.
- 11. Riljak Vladimír, 5.r.
- 12. Říha Pavel, 3.r.
- 13. Štrnadová Hana, 6.r.
- 14. Šedý Jiří, 5.r.
- 15. Teplický Marian, 3.r.
- 16. Zápotocký Michal, 5.r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

Předseda: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.
Členové: prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.
prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc.
doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.

**HLADINA HETEROPLAZMIE, MTDNA MUTACÍ PŘI PŘÍPRAVĚ TRANSMITOCHONDRIÁLNÍCH CYBRIDŮ****Autoři:** Olga Brantová, Ing. Markéta Tesařová, J. Sládková, L. Černá, J. Houštěk a Jiří Zeman**Školitel:** prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. LF a VFN

Mitochondriální poruchy se projevují velmi různorodými onemocněními jejichž společnou charakteristikou jsou defekty v systému oxidační fosforylace (OXPHOS). Systém OXPHOS je jako jediná výjimka v savčím organismu kódován funkčním propojením genů v mitochondriální DNA (mtDNA) a jaderné DNA (nDNA). Transmitochondriální cybridy (buňky vzniklé fúzí enukleovaných fibroblastů s r0 buňkami, buňky zbavené vlastní mtDNA) jsou využívány k rozlišení příčiny onemocnění, mtDNA nebo nDNA. V naší studii byla technika transmitochondriálních cybridů využita ke studiu vlivu jaderného pozadí na fenotypové projevy mutací mtDNA.

Materiály a metody: Ke studiu bylo použito 7 linií fibroblastů od 7 pacientů s heteroplasmickou mtDNA mutací A3243G, množství mutované mtDNA bylo 27%, 33%, 19%, 58% a 34% a jedna linie fibroblastů s mtDNA mutací A8344G, heteroplazmie 47%. Hladina heteroplazmie mtDNA mutací byla stanovena denzitometricky pomocí radioaktivní PCR-RFLP analýzy. Metoda Southern blotu byla využita k analýze množství mtDNA ve zkoumaných buňkách.

Výsledky: Po transfekci, která je prvním krokem při přípravě rho 0 buňek z fibroblastů, došlo k prudké změně v hladinách heteroplazmie mtDNA mutací a to až o 49%. Ve 2 liniích nebylo možné po transfekci mutaci mtDNA A3243G detekovat, v ostatních liniích došlo k nárůstu množství mutované mtDNA. V průběhu dlouhodobé kultivace nebyly zaznamenány změny v hladině heteroplazmie, ani celkové množství mtDNA se v průběhu experimentu neměnilo.

Závěr: Ve studovaných buněčných liniích fibroblastů došlo po transfekci k výrazným změnám v množství mutovaných mtDNA molekul. Domníváme se, že tyto změny mohou být způsobeny existencí rozdílů v hladinách heteroplazmie mezi jednotlivými fibroblasty dané buněčné linie.

*Podpořeno GA UK 4/2002/c***UŽITÍ MAKROPORÉZNÍCH POLYMERŮ NA BÁZI 2-HYDROXYETHYLMETHAKRYLÁTU PŘI EXPERIMENTÁLNÍCH OPERACÍCH MÍCHY****Autoři:** Aleš Hejčl, Petr Lesný, Martin Příkladný, Pavla Jendelová, Jiří Michálek, Eva Syková**Školitel:** prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., Ústav Experimentální medicíny AVČR

Trauma či jiná poškození míšni vedou v místě léze ke tvorbě gliové jizvy, ve které nedochází ke tvorbě a přenosu nervového impulsu. Tkáň vytvořená v jizvě dále inhibuje regenerační procesy v míše. Biokompatibilní makroporézní polymerní hydrogely implantované do místa léze brání tvorbě jizvy a zároveň slouží jako strukturální opora pro regeneraci míchy. Bylo operováno 26 laboratorních potkanů, u nichž jsme v celkové anestezii provedli laminectomii ve dvou až třech segmentech v úrovni Th 6-8. Poté jsme otevřeli a vyvėsili duru mater. Skalpelem a mikronůžkami jsme provedli hemisekci o délce 1 mm. Po zajištění hemostázy jsme vložili hydrogel, který jsme velikostí přizpůsobili lézi. Použité hydrogely byly kopolymery 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) s kyselinou methakrylovou (MA) a [2-(methakryloyloxy)ethyl] trimethylamonium chloridu (MOETACI). Všechny hydrogely měly shodné mechanické vlastnosti a porozitu, lišily se ale elektrickým nábojem na povrchu. Dura mater byla zašita a celé místo bylo překryto svaly, podkožím a kůží. Po měsíci byla část míchy obsahující hydrogel vyoperována a zpracována histologicky a imunohistochemicky. V implantovaných hydrogelech jsme po jednom měsíci pozorovali vrůstání buněčných elementů. V hydrogelech jsme našli GFAP-pozitivní astrocyty a NF160-pozitivní axony, většina buněk, vrůstajících do hydrogelů, však měla morfologické vlastnosti vazivových elementů. Všechny implantované hydrogely byly obaleny vazivovým pouzdrém. Biokompatibilní hydrogely aplikované do míšni léze vytvářejí v místě léze prostředí, kterým mohou přispět k regeneraci poškozené tkáně. Modifikací fyzikálně-chemických vlastností takového prostředí dosáhneme zlepšení jejich podpůrného efektu při regeneraci míšni tkáně.

Podporováno granty LN00A065, MŠMT ČR J13/98:11100004, AVOZ 5039906-1024, GAČR: 304/03/1189.

EXPRESE MUSKARINOVÝCH A B-ADRENERGNIÍCH RECEPTORŮ V SRDEČNÍ A PLICNÍ TKÁNI MYŠÍHO KMENE 129S6 JAKO PRVNÍ FAZE PRO SROVNÁNÍ STAVU S KMENE 129S6 S KNOCKOUTOVANÝM GENEM PRO ACETYLCHOLINESTERASU

Autoři: Martin Klein, Marian Teplický

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

Úvod. Muskarinové a b-adrenergní receptory patří mezi receptory spřažené s G proteiny. Mění-li se intenzita signálu, která na ně působí, mohou se jejich vlastnosti a počet změnit. Nastává-li tato eventualita u ovlivňovaných receptorů, hovoříme o homologní regulaci, mění-li se vlastnosti či počet i jiných receptorů, jde o regulaci heterologní. Cílem této práce je ověřit homologní a heterologní regulaci počtu muskarinových acetylcholinových receptorů (MR) a â-adrenergních receptorů (â-AR) u myši kmene 129S6. Metodika. Stanovovali jsme počty receptorů v tkáni myších srdcí a plic zvířat kmene 129S6 metodou vazebných pokusů se specifickými tritiovými antagonisty: [³H]QNB pro MR, [³H]CGP pro â-AR za použití scintilačního počítáče Beckman LS1801. Pracovali jsme metodou duplikací 3 vzorků z 10 zvířat. Výsledky. Počet receptorů (B_{MAX}): B_{MAX} (srdce, MR) = 2,14 ± 0,32 fmol/mg tkáně; B_{MAX} (srdce, b-AR) = 1,57 ± 0,25 fmol/mg tk.; B_{MAX} (plíce, MR) = 6,76 ± 0,77 fmol/mg tk.; B_{MAX} (plíce, b-AR) = 40,22 ± 5,81 fmol/mg tk. Závěr. Naše výsledky počtů muskarinových a b-adrenergních receptorů u kmene 129S6 nebyly podle našich zjištění dosud v dostupné světové odborné literatuře zveřejněny. Uvedené receptorové charakteristiky kmene 129S6 jsou nezbytným předpokladem pro druhou etapu výzkumu stanovování exprese receptorů u myši kmene 129S6 s knockoutovaným genem pro acetylcholinesterasu.

ZMĚNY MNOŽSTVÍ NO PRODUKUJÍCÍCH BUNĚK V PONTOMESENCYPHALICKÉM PŘECHODU U KRYSY V ZÁVISLOSTI NA VĚKU JEDINCE.

Autor: Martin Magner

Školitel: prof. MUDr. Pavel Petrovický, DrSc., Anatomický ústav 1. LF UK

Největší koncentrace NO produkujících buněk v mozковém kmene je ponto-mesencephalický přechod a jeho jádra – ncl. latero-dorsalis (L-D) a komplex ncl. pedunculo-pontinus a ncl. parabrachialis (PePo). Obě jádra jsou zapojena do aktivačního systému. Cílem naší práce bylo zjištění, jaký podíl na těchto funkcích může mít přítomnost NADPH-d v závislosti na věku.

Studovali jsme soubor 38 krys kmene Wistar v časovém rozmezí – den porodu až dospělost. Věkové intervaly byly: v prvním týdnu – každý den, ve 2.a 3. týdnu každý třetí den a dále každý sedmý den až do věku 100 dní. K průkazu NADPH-diaphorasy jsme použili pražské modifikace metody podle Scherer-Singler et al. (1983). Sledovaná jádra jsme studovali ve třech základních úrovních – I. (Baringtonovo jádro), II. (začátek aqueductus mesencephali) a III. (commissura colliculorum inf.). V těchto úrovních jsme stanovovali absolutní počty NADPH-d pozitivních buněk (dále NO b.) a v jednotlivých věkových skupinách jsme je pak vyjádřili jako procento stavu v den porodu. Stranová asymetrie byly minimální a proto nebyla zohledňována. Jako reprezentativní se jevila úroveň II. Počet NO b. v L-D dosahuje prvního maxima – 230% ve třetím dni věku, po mírném poklesu na 170% v 7. dni následuje 16. den druhé maximum – opět 230%. Toto maximum klesá na hodnotu 120% v dospělosti. Počet NO b. v PePo má první maximum – 200% v pátém dnu, po mírném poklesu ke 150% v sedmém dnu se počet NO b. opět zvyšuje ke druhému maximu – 320% v 16. dnu. Toto maximum potom zvolna klesá na hodnotu 150% v dospělosti.

VOLTAGE-DEPENDENT K⁺ AND NA⁺ CURRENTS IN ASTROCYTES AFTER EXPOSURE TO ELEVATED K⁺ CONCENTRATION

Autoři: Helena Neprašová, M. Anděrová, D. Petřík, A. Chváta

Školitel: prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., Department of Neuroscience, Institute of Experimental Medicine, ASCR Prague

Increased extracellular $[K^+]_e$ has been observed in many pathological states. In astrocytes, exposure to elevated extracellular K^+ evokes changes in their morphology and GFAP expression, ultimately leading to astrogliosis. Using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration, we studied changes in the membrane currents of astrocytes in spinal cord slices from 10-day-old rats after exposure to high K^+ concentration. The lumbar part of the spinal cord was incubated for 3 hours in artificial cerebrospinal fluid (ACF) containing 50 mM K^+ . Cells were identified as astrocytes by positive immunostaining for GFAP or S100 β . In astrocytes with complex current pattern, characterized by the expression of inward rectifier K^+ (K_{IR}), A-type K^+ (K_A), delayed outward rectifying K^+ (K_{DR}) and Na^+ currents (I_{Na}), 50 mM K^+ incubation caused the up-regulation of I_{Na} and down-regulation of K_A currents. Astrocytes characterized by passive K^+ currents were divided into 2 groups according to the expression of additional voltage-activated currents: astrocytes (A1) with K_{IR} and K_A currents,



and astrocytes (A2) with K_A and K_{DR} currents. In both A1 and A2 astrocytes, a down-regulation of K_A currents was observed after exposure to 50 mM K^+ . The membrane potential of all astrocytes was shifted to more positive values. We conclude that in mature astrocytes (complex, A1 and A2), the incubation of the spinal cord in 50 mM K^+ results in the down-regulation of K_A currents. In addition, up-regulation of I_{Na} was observed in complex astrocytes.

AKTIVITA NAD(P)H OXIDÁZY V CIEVNEJ STENE NORMOTENZNÉHO A HYPERTENZNÉHO POTKANA.

Autor: Michal Orlický

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

Fibroblasty, hladké svalové bunky a endotelové bunky cievnej steny produkujú superoxid ($O_2^{\cdot-}$) systémom NADH a NADPH oxidáz. Superoxid rýchlo reaguje s NO, ktorého vazodilatačný účinok je dobre popísaný, deaktivuje ho a takto spôsobuje vazokonstrikciu. Týmto spôsobom by mohli systémy NADH a NADPH oxidáz regulovať tonus cievnej steny a krvný tlak a ich porucha by mohla viesť k hypertenzii a arteroskléroze.

Cieľom našej práce bolo zaviesť metódu, pomocou ktorej by bolo možné merať aktivity NADH a NADPH oxidáz pre ďalšie štúdium úlohy týchto systémov pri hypertenzii.

Vychádzali sme z fotometrickej metódy s nepermeabilným derivátom formazanu WST-1 (CAS 150849-52-8), ktorý redukciou mení farbu.

Redukcia WST-1 bunkami je inhibovateľná superoxididizmutázou a tironom (syntetický špecifický scavenger superoxidu), takže redukčným agens, ktoré reaguje s WST-1 je s najväčšou pravdepodobnosťou $O_2^{\cdot-}$. Dajú sa rozlíšiť tri systémy redukujúce WST-1: (1) povrchová NADH a (2) povrchová NADPH oxidáza, ktoré ako zdroj elektrónov využívajú extracelulárne pridané nukleotidy, a (3) systém závislý na intracelulárnych zdrojoch elektrónov. Metóda môže byť použitá na meranie v mikrotitračných doštičkách a je preto vhodná na zisťovanie vplyvu rôznych látok na produkciu superoxidu bunkami.

Produkcia superoxidu bola meraná na bunčných kultúrachw fibroblastov aorty normotenzného (Wistar a Brown Norvergicus) a spontánne hypertenzného (SHR) potkana. Preukázali sme produkciu $O_2^{\cdot-}$ v normotenzných i hypertenzných bunčných kultúrach, pričom na fibroblastoch hypertenzného potkana sme zistili vyšší transmembránový elektrónový prenos. Na stimuláciu angiotenzinom II (AT II), reagovala každá kultúra produkciou $O_2^{\cdot-}$ odlišne. Difenylenjodinium (DPI), inhibítor flavínových enzýmov vrátane NADH a NADPH oxidáz, zrušil efekt AT II na bunky.

Tieto výsledky podporujú hypotézu, že porucha regulácie tvorby reaktívnych foriem kyslíka NADH/NADPH oxidázami môže hrať rolu v patogenéze hypertenzie.

Podporené grantom Karlovej univerzity GAUK 16/00/1.LF/C a GAČR303/02/1282/A.

EFFECT OF TOTAL BODY IRRADIATION DOSE TOGETHER WITH PROPER TIMING BETWEEN CYCLOPHOSPHAMIDE AND IRRADIATION ON ENGRAFTMENT OF DONOR CELLS IN EXPERIMENTAL MURINE MODEL OF BONE MARROW TRANSPLANTATION

Autor: Tereza Pelichovská, Luděk Šefc

Školiteľ: RNDr. Luděk Šefc, CSc., Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK

Objective . Cyclophosphamide (CY) and total body irradiation (TBI) are together used as conditioning regimen for patients indicated for bone marrow transplantation. However, TBI exerts significant toxic side effects, mainly on pulmonary, kidney, heart muscle and intestinal tissues. This also influences the morbidity and mortality of transplanted patients. We have used a murine model to examine what effect has TBI dose on bone marrow engraftment.

Materials and Methods. C57B1/6 Ly5.2 and congenic Ly5.1 mice were used. Mice were pretreated with CY (135mg/kg)i.p., and after 2, 5 or 7 days underwent 0, 2, 4, 6 or 8 Gy of TBI. Control mice were irradiated only. Two hours after TBI, mice were transplanted with $2 \cdot 10^6$ bone marrow cells. The chimerism (% of donor hematopoiesis) was repeatedly measured in individual mice. The ratio between Ly5.1 and Ly5.2 mononuclear cells were determined in peripheral blood using Becton Dickinson FACScan cytometer.

Results. Control mice without CY achieved stable chimerism according to TBI dose (2, 4, 6 Gy) approx 5%, 25% and 50%. CY administered 2 days prior TBI led to significantly lower engraftment of donor cells, reaching maximal 25% even if higher dose was delivered (4, 6, 8 Gy resp). On the other hand, percentage of chimerism in mice pretreated with CY 5 or 7 days before TBI and even reduction of TBI doses (2, 4 Gy) led to significantly high chimerism of more than 70%.

Conclusion. The engraftment after bone marrow transplantation depends on proper timing between CY and TBI. This regime allows reduction of TBI by 50% and still resulting in significantly high chimerism.

KVANTIFIKÁCIA BUNIEK VO VZORKE STANOVENÍM DSDNA POMOCOU BIS-BENZIMIDU

Autor: Roman Pethö

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

Všeobecným problémom pri pokusoch prevádzaných na materiále z tkanivových kultúr je kvantifikácia buniek vo vzorkách. Pri nemožnosti ich priameho rátania možno síce využiť niektorú z metód nepriamej kvantifikácie popísaných v literatúre, avšak ich použitie je limitované. V tejto práci sme sa zamerali na kvantifikáciu buniek stanovením dsDNA pomocou fluorescenčnej sondy bis-benzimidu (Hoechst 33258, CAS 23491-45-4).

wBis-benzimid je interkalačné farbivo, ktoré sa viaže na A-T páry dsDNA, pričom dochádza k zosilneniu jeho fluorescence. RNA, ssDNA, ani oligonukleotidy fluorescence nezosilňujú.

Problémom tejto techniky však je, že DNA pre stanovenie bis-benzimidom musí byť uvoľnená z histónov a dobre homogenizovaná vo vzorke. Rôzni autori popísali niekoľko spôsobov ako toho dosiahnuť, napr. použitím roztoku o vysokej iónovej sile, dodecylsírany sodného (SDS) alebo heparínu. Roztok o vysokej iónovej sile, dobre fungujúci s čistou DNA, nedokázal z homogenátu buniek uvoľniť DNA dostatočne reprodukovateľne. Použitie SDS viedlo k nešpecifickému vzostupu fluorescence sondy, čoho dôsledkom bola opäť nereprodukovateľnosť výsledkov. Ako najvýhodnejšie sa ukázalo použitie desaťminútovej extrakcie DNA z buniek pomocou roztoku obsahujúceho 7,7 % amoniaku a 0,4 % Tritonu X-100 pri 37 °C. Potom bola vzorka doplnená ľadovým Tris-HCl pufróm (10 mmol.l⁻¹, pH 7,0) s NaCl (0,1 mol.l⁻¹). Aby sme zabránili rozštiepeniu dsDNA vo vzorke prítomnými DNázami, obsahoval roztok 10 mmol.l⁻¹ EDTA. K takto pripravenej vzorke sme pridali bis-benzimid (1 ěg.ml⁻¹) a zmes bola inkubovaná 30 minút pri 37 °C potme. Fluorescencia bola meraná pri excitácii 354 nm, šírka štrbiny 5 nm, emísii 460 nm, šírka štrbiny 5 nm. Tento postup zaručoval dobrú linearitu a reprodukovateľnosť meraní pre suspenzie obsahujúce 1 až 2.10⁵ buniek na 1 ml.

FUNKČNÁ AKTIVÁCIA MOZGU PRI BOLESTIVEJ STIMULÁCII, ZMENY PRI SÚČASNEJ SVALOVEJ KONTRAKCII.

Autoři: Hubert Poláček, Jiří Vrána, Róza Rachmanová

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

Úvod: Aj napriek komplexným znalostiam o anatomickej štruktúre mozgu človeka a mnohým prácam, ktoré sa zaoberajú jeho funkciou, stále nepoznáme funkčný význam a variabilitu zapojenia štruktúr mozgu dokonca ani pri spracovávaní najjednoduchších podnetov.

Cieľom práce je na základe funkčného EEG a fMRI vyšetrenia dobrovoľníkov poskytnúť nový pohľad na procesy odohrávajúce sa v mozgu počas krátkodobej bolestivej stimulácie a ukázať ako sú aktivácie v jednotlivých kôrových oblastiach alterované súčasne vykonávanou svalovou kontrakciou (zistiť oblasti prípadného gatingu bolestivého signálu).

Metodika: Dobrovoľníci (10 mužov, pravákov) boli v prvej časti experimentu bolestivo stimulovaní krátkodobými elektrickými pulzami na prostredníku pravej ruky, v druhej časti stláčali medzi palcom a ukazovákom pravej ruky elastický gumený valček a v tretej časti súčasne stláčali valček a boli bolestivo stimulovaní. Hemodynamická odpoveď mozgu bola u každej osoby snímaná 1,5 T MR (Siemens Magnetom Vision). Údaje boli vyhodnotené s použitím programov BrainVoyager™ a Statistica 6.0.

Výsledky: Pri bolestivej stimulácii boli zistené aktivácie bilaterálne v inzule, frontálnom operkule a sekundárnej somatosenzorickej oblasti, kontralaterálne v talame, primárnej somatosenzorickej oblasti a sekundárnej motorickej oblasti, ipsilaterálne v prednom laloku mozočka a premotorickej oblasti, pri kontrakcii okrem všetkých spomenutých ešte v primárnej motorickej oblasti. Pri oboch podnetoch súčasne boli všetky oblasti aktívované výraznejšie, navyše sa zvýraznila aktivácia ipsilaterálnej primárnej somatosenzorickej oblasti.

Súčet aktivácií pri jednotlivých podnetoch bol vo všetkých oblastiach menší ako pri oboch podnetoch spracovávaných súčasne, na gatingu sa však (aktívne) podieľalo hlavne okolie kontralaterálneho centrálného sulku, ipsilaterálna inzula, sekundárna somatosenzorická oblasť, frontálne operkulum a predný lalok mozočka.

Záver: Hemodynamická aktivácia funkčných oblastí mozgu pri súčasnom pôsobení bolesti a svalovej kontrakcie sa nedá vysvetliť súčtom aktivácií pri jednotlivých podnetoch. Výsledky ukazujú zvýšenie objemu aj intenzity aktivácie jednotlivých oblastí pri súčasnom pôsobení oboch podnetov.

**EXPRESI EPITOPŮ ROZPOZNATELNÝCH GALEKTINEM-1 V JÁDRECH LIDSKÝCH KERATINOCYTŮ****Autoři:** Josef Pražák, Barbora Dvořánková, Zuzana Holíková, Hans-Joachim Gabius, Karel Smetana
Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc., Anatomický ústav 1. LF UK

Galektiny představují rodinu cca 20 endogenních lektinů rozpoznávajících β -galaktosidy. Jejich funkce nevyžaduje přítomnost dvojmocných kationtů. Jsou exprimovány řadou buněk a podílejí se na mezibuněčných interakcích a interakcích buněk s mezibuněčnou hmotou. Galektiny-1 a -3 se vyskytují i v buněčných jádrech a hrají významnou úlohu při sestřihu pre-mRNA. Údaje o expresi jaderných epitopů rozpoznatelných oběma galektiny nejsou známy. V této studii byly použity biotinylované rekombinantní galektiny-1, -3, -5 a -7, jejichž pomocí byla zjišťována přítomnosti příslušných ligandů v jádrech kultivovaných epidermálních buněk. Pro funkční charakterizaci buněk byla zároveň znázorňována intermediární filamenta. Proliferující buňky byly zjišťovány pomocí průkazu proteinu Ki-67 a buňky kmenové byly znázorněny průkazem proteinu Δ Np63 α . Možný vztah vazby galektinů k sestřihu pre-mRNA byl odhadován průkazem sestřihového faktoru SC-35. Rekombinantní galektiny-3, -5 a -7 nerozpoznávaly epitopy v buněčných jádrech keratinocytů. Galektin-1 se vázal na buněčná jádra keratinocytů izolovaných z vlasových folikulů avšak nerozpoznával jádra keratinocytů izolovaných z interfolikulární epidermis. Buňky s jádry s vazebnými místy pro galektin-1 byly negativní při průkazu cytokeratinu-10 a pozitivní při průkazu cytokeratinového peptidu 37. Galektin-1 reaktivní epitopy se nacházely u buněk s Ki-67 pozitivními i negativními jádry. Většina buněk s galektin-1 reaktivními jádry exprimovala Δ Np63 α . U většiny galektin-1 pozitivních buněk nebyla pozorována kolokalizace vazebných míst pro galektin-1 s faktorem SC-35. Obě molekuly se však nacházely v těsné blízkosti. Závěrem lze shrnout, že galektin-1 rozpoznává buňky odvozené z vlasových folikulů o nichž je známo, že obsahují multipotentní epidermální kmenové buňky. Vazebná místa pro galektin-1 se v jádrech nacházejí v blízkosti tzv. „nuclear speckles“, které exprimují sestřihový faktor SC-35, a mají tak pravděpodobně vztah k sestřihu pre-mRNA.

MORFOLOGICKÁ ALTERACE NEURONÁLNÍCH BUNĚK HIPPOCAMPU LABORATORNÍHO POTKANA INDUKOVANÁ SUKCESIVNÍM PODÁVÁNÍM KYSELINY KAINÁTOVÉ**Autor:** Riljak Vladimír
Školitel: doc. MUDr. Miloš Langmeier DrSc., Fyziologický ústav 1. LF UK

Náplň projektu

Existuje rozsáhlé písemnictví dokumentující účinky kyseliny kainátové na živý organismus i buněčné kultury. Invencí tohoto experimentu má být prošetření histopatologického nálezu v kainát-vulnerabilní části hippocampální formace, po vícenásobném podání této látky.

Úvod

Kyselina kainátová je jedním z mnoha agonistů glutamátových receptorů. Tyto jsou klasifikovány na skupinu metabotropních a ionotropních receptorů. Druhá ze jmenovaných skupin zahrnuje integrální kationt-specifické komplexy dělené na receptory NMDA, AMPA a receptory kainátové. Podávání alfa-kyseliny kainátové, mající velmi potentní aktivitu na glutamatergní systém bezobratlých i obratlovců /projevující se mohutnou depolarizací/ je ideálním modelem řady patofyziologických stavů /epilepsie, Alzheimerova choroba/.

Neurotoxickým a neuroplastickým účinkům této látky je věnována značná pozornost, neboť studium zániku neuronálních buněk po jím vyvolaném inzultu by mohlo podhalit elementární principy neuroplastických pochodů v CNS.

Metodika

V našem modelu byla kyselina kainátová podávána i.p. ve třech dávkách ob jeden den, vždy 8mg/1000g a po dvou dnech byla zvířata /laboratorní potkan typu Wistar/ perfundována perfúzním roztokem v hluboké pentobarbitalové narkóze. Mozky byly následně zpracovány na zmrazovacím mikrotomu a podrobeny DNA barvení /Hoechst/ s Fluoro-Jade B k odlišení přežívajících a odumírajících buněk.

Výsledky

Fluoro-Jade B pozitivní buňky byly přítomny hlavně v CA1 oblasti hippocampu, částečně také v hilus gyri dentati. CA3 oblast a oba listy gyrus dentatus byly v zásadě nepoškozeny. Barvení na DNA odhalilo signifikantní redukci počtu buněk v oblasti CA1, bez větších změn v CA3 oblasti a gyrus dentatus. Pozorovali jsme rovněž značnou dilataci komorového systému.

Závěr a diskuse

Klíčovou otázkou je pochopitelně to, zda pozorované změny jsou vyvolány hyperexcitací nervových buněk a jejich následnou smrtí nebo zda jsou spíše důsledkem přímého neurotoxického účinku /daného produkcí volných kyslíkových radikálů/ kyseliny kainátové. Na tuto otázku není jednoduché odpovědět. Výše zmíněná dilatace ventrikulárního systému svědčí spíše pro přímý toxický efekt kainátu. Neopominutelná je však i role tkáňové hypoxie způsobená právě hyperexcitací nervových buněk. Jednou z cest, která by snad citlivěji diskriminovala oba mechanismy buněčné smrti, by mohlo být podání specifických antagonistů kainátových receptorů. V těchto otázkách je mnoho nejasného a poznání na samém počátku.

THE TRANSFER OF MUTANT CD36 GENE FROM SHR/OLA, SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT, ONTO GENETIC BACKGROUND OF PD/CUB STRAIN, MODEL OF METABOLIC SYNDROME X

Author: Pavel Říha

Advisor: prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc., Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Essential hypertension, insulin resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia and obesity are one of the most severe health threats for population. From the genetic point of view, multiple genes as well as gene – gene and gene – environment interactions determine these very complex disorders.

The deletion mutation of Cd36/Fat in the SHR was identified as one of the important factor involved in insulin resistance. In order to better understand its role in metabolic disorders, it was decided to develop a new rat congenic strain PD.SHR-Cd36 by transferring mutant Cd36/Fat gene from SHR strain onto the genetic background of PD/Cub strain. SHR is widely recognized animal model of essential hypertension with dyslipidemia and insulin resistance. PD/Cub is the recently established animal model of the metabolic syndrome X.

Cross – intercross and backcross mating has been used for the development of the congenic strain. The equivalent of six backcross generations has been reached in the derivation of PD.SHR-Cd36 congenic strain.

Isolated DNA acquired from the tail biopsies of bred animals was genotyped using primer amplifying fragments in intron 13 and exon 14 of Cd36 gene. To distinguish heterozygosity in Cd36 region of RNO4 polymorphisms in the flanking microsatellite markers D4Rat7, Il6 and D4Bro1 were used. After the electrophoresis on acrylamide gel the PCR products were visualised with ethidium bromide.

The preliminary results gained in the fourth generation show a significant difference ($P = 0,019$; unpaired two-tailed t-test) in mean serum triglycerides levels between PD ($2,13 \pm 0,15$ mmol/l) and PD.SHR-Cd36 ($2,70 \pm 0,14$ mmol/l). After the congenic strain is completed, the role of the mutant Cd36 gene in the model of the metabolic syndrome X will be analyzed.

This study was supported by grant GA ČR 303/01/1010

INFLUENCE OF THE PROLONGED HYPOBARIC HYPOXIA ON THE REFERENCE MEMORY

Authors: Pavel Říha, Michal Wittner

Advisors: prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc., doc. MUDr. Dana Marešová, CSc., MUDr. Mgr. Michal Wittner, Institute of Physiology, First Faculty of Charles Medicine University in Prague

The hypobaric hypoxia causes a decrease of tissues' oxygenation and severely alters physiological and psychological processes in the elevation and duration dependent way. To extent these findings we assessed the cognitive and motor consequences of the exposure to the severe hypobaric hypoxia of various duration.

Twenty male Long Evans rats aged 110 ± 10 days (mean \pm SD) at the beginning of the experiment were trained in the Morris water maze to master the allothetic navigation task based on the finding of the submerged platform. The permanent memory trace was let to consolidate for 200 days. Afterwards these rats (aged 330 ± 20 days; mean \pm SD) were exposed to the control conditions or to the hypobaric hypoxia (atmospheric pressure 400 hPa; simulated altitude 7000 m; ambient temperature 18 °C) lasting (a) 1 hour, (b) 4 hours, (c) 16 hours, (d) 32 hours. The rats were tested in the Morris water maze immediately after the returning to the normobaric conditions and again on each of the following three days.

Rats' escape track lengths revealed that the severe hypobaric hypoxia lasting 4 hours or less had no influence on the rats' reference memory recall. The prolonged hypobaric hypoxia lasting 16 and 32 hours resulted the significant ($P = 0.0018$, one-way ANOVA) reference memory impairment pronounced mostly one day after the ending of the hypobaric hypoxia. That day the rats' mean \pm SEM escape track lengths were 1.29 ± 0.17 m, 1.28 ± 0.07 m, 1.32 ± 0.11 m, 2.65 ± 0.25 m, 4.50 ± 0.37 m (control group and groups exposed to 1, 4, 16 and 32 hours of the hypobaric hypoxia respectively). The reference memory impairment diminished during next days. Escape latencies changed in the same way as track lengths.

No rats' average swim speed changes that served as an indicator of the motor component of the task were observed, neither other obvious motor impairments such as disorders of the motor coordination and the hypodynamia.

The results are consistent with analogous studies suggesting the reference memory impairment after the hypobaric hypoxia is caused by the decrease in tissues' oxygenation, the hippocampal cholinergic functions decrease, the development of the high altitude cerebral edema, the decompression sickness, or indirectly due to the hypoxia induced retinopathy.

RŮST A DIFERENCIACE MEZENCHYMOVÝCH KMENOVÝCH BUNĚK U PACIENTŮ S LYMFODINÍMI MALIGNITAMI

Autoři: MUC. Hana Strnadová, Mgr. Tereza Purkrábková, MUDr. Petra Obtrlíková, MUDr. David Stehlík
Školitel: MUDr. Robert Pytlík, I. interní klinika 1. LF a VFN

Úvod a metodika. V předkládané práci jsme studovali růstové a diferenciací vlastnosti mezenchymových kmenových buněk (MSC) u pacientů s lymfoidními malignitami. Buňky byly odebírány po podpisu informovaného souhlasu od pacientů podstupujících rutinní trepanobiopsii kostní dřene z diagnostické či kontrolní indikace. Buňky byly pěstovány v kompletním α -médium (α -MEM + 20% fetální telecí sérum + penicilin + streptomycin + glutamín) v úvodní koncentraci 10^5 nebo 7.5×10^6 buněk na 75 cm^2 kultivační láhev a v počtu 10^5 na 100 mm Petriho miskách. Ve druhé pasáži byly buňky pěstovány ve 100 mm Petriho miskách v koncentracích 1,5, 3, 5 a $10/\text{cm}^2$. Hodnocen byl celkový počet buněk a počet kolonií z 1. a 2. pasáže (CFU-F 1, CFU-F2). Osteogenní diferenciací byla zkoumána kultivací v osteogenním médium (kompletní α -médium + fosfát kyseliny askorbové + glycerol-fosfát + dexamethason) a následným von Kossovým barvením na mineralizaci a barvením na alkalickou fosfatázu. Myogenní diferenciací byla zkoumána pomocí 24-hodinové inkubace s 5azacytidinem. Inkorporace bromodeoxyuridinu (BrDU) byla zkoumána standardními metodami.

Výsledky. Počet kolonií z 1. pasáže nebyl závislý na věku, pohlaví či onemocnění pacienta, koreloval pouze s počtem adheřujících fibroblastových buněk ($r = 0.772$, $p < 0.001$). Počet kolonií z 2. pasáže při úvodním inokulu 10 buněk v 1. pasáži vykazoval výraznou závislost na diagnóze: u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií a mnohočetným myelomem byl pozorován signifikantně větší počet kolonií než u pacientů s lymfomem ($p = 0.04$ až 0.007). Tyto výsledky byly potvrzeny i z inokula 7.5×10^6 buněk z 1. pasáže. Kypodivu, při nasazení 7.5×10^6 buněk do první pasáže jsme pozorovali vyšší počet kolonií v pasáži druhé, bez ohledu na stejný počet nasazovaných buněk.

Nejvýraznější inkorporaci bromodeoxyuridinu se nám podařilo prokázat u buněk 5-8. den po přesazení do nového média (25-100% v jednotlivých koloniích). Po 2 až 3 týdnech kultivace jsme nepozorovali téměř žádnou inkorporaci BrDU.

Při kultivaci v osteogenním médium se nám podařilo prokázat jak tvorbu alkalické fosfatázy, tak mineralizační jádra pomocí von Kossova barvení. Buňky si tedy udržely svou schopnost diferenciací do osteoblastové linie. Po 24-hodinové inkubaci s 5-azacytidinem jsme již v průběhu prvního týdne další kultivace pozorovali tvorbu syncytií a po 4 týdnech barvení na specifické myogenní markery.

Závěr. Kultivací MSC u pacientů s lymfoidními malignitami jsme pozorovali a) rozdílný typ růstu v závislosti na druhu malignity, b) schopnost diferenciací těchto buněk do specializovaných buněk mezenchymových linií. Tato zjištění mohou mít roli při zkoumání úlohy MSC v patogenezi hematologických malignit i v terapeutickém využití této buněčné populace.

Práce byla podporována grantem GAUK No 203710 19/02 a Výzkumným záměrem No 206019-1.

NADMĚRNÁ EXPRESE NEUROTOFINU-3 VE SVALECH MYŠI S VYŘAZENÝM GENEM *ER81* ZACHRÁNÍ AXONÁLNÍ PROJEKCE PROPRIOCEPTIVNÍCH NEURONŮ K MOTONEURONŮM

Autor: Jiří Šedý

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

Úvod. ER81, člen ETS rodiny transkripčních faktorů, je klíčový faktor regulace projekcí propioceptivních Ia neuronů k míšním motoneuronům (Arber et al., 2000). Er81(-/-) mutantní myši mají výrazné poruchy motoriky, rezultující z chybění těchto projekcí a s tím spojené redukce počtu svalových větének ve svalech. Neurotrophin-3 (NT-3) je růstový faktor patřící k neurotrofinům, který mimo jiné facilituje funkci Ia aferentních neuronů a utváření svalových větének (Chen et al., 2002). Chybění NT-3 ve svalu má za následek vymizení svalových větének (Ernfors et al., 1994). U dvojité mutantní myši Er81(-/-);myo-NT-3, která ve svalu exprimuje zvýšené množství NT-3 se svalová věténka tvoří a pohybová aktivita je zachována. Naším cílem bylo zjistit, zda v tomto případě budou projekce Ia aferentních vláken k motoneuronům zachovány.

Materiál a metody. Do spinálních ganglií myši (Er81(-/-);myo-NT-3, Er81(-/-), myo-NT-3, wild type) fixovaných perfuzí 4% PFA bylo aplikováno lipofilní barvivo DiI. Pak byly tkáně 7 dní inkubovány při 40°C ve 4% PFA. Vypreparovaný úsek míchy byl zalit do 3,5% agaru, krájen na vibratomu a řezy byly studovány ve fluorescenčním mikroskopu s rhodaminovým filtrem a fotografovány.

Výsledky. U Er81(-/-) mutantních myši jsme v segmentech L_2 - L_5 pozorovali podobně jako Arber et al. (2000) výraznou redukci projekcí propioceptivních Ia neuronů k motoneuronům. Navíc se ukázalo, že redukce vykazuje určitý gradient. V segmentu L_5 byl úbytek vyjádřen nejméně, v úrovni L_2 nejvíce. U Er81(-/-);myoNT-3

dvojitých mutant byla hustota projekcí srovnatelná s kontrolou. U samotné myo-NT-3 mutanty jsme výrazněji zvýšenou denzitu projekcí nezjistili.

Závěr. Nadměrná exprese NT-3 ve svalu zabrání ztrátě projekcí sensitivních Ia neuronů k motoneuronům podmíněné absencí Er81. Molekulární mechanismus této kompenzace není zatím jasný. Předpokládáme, že nadexprese NT-3 ve svalu aktivuje v Ia neuronech některý z dalších genů ETS rodiny, který zastoupí chybějící ER81. Tuto možnost naznačuje zjištění, že již samotná exprese *Er81* je podmíněna působením NT-3 (Patel *et al.*, 2003).

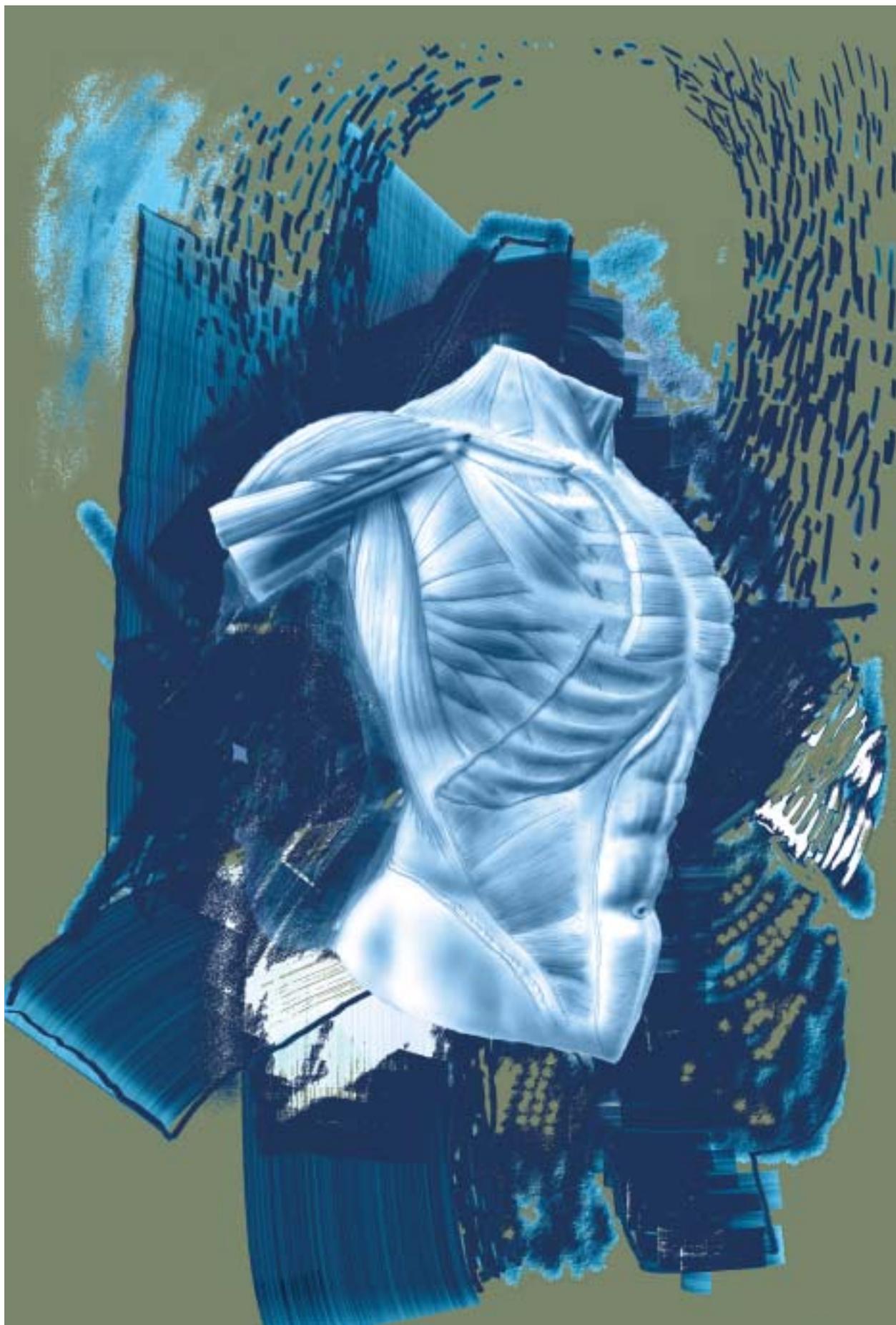
VLIV DLOUHODOBÉHO PŮSOBENÍ 9-[2-(FOSFONOMETHOXY)ETHYL]-2,6-DIAMINOPURINU (PMEDAP) NA NÁDOROVÉ BUNĚKY

Autor: Michal Zápotocký,

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

Úvod: PMEDAP je kompetitivním substrát-inhibitorem pol d a zároveň podmiňuje terminaci DNA řetězce de novo. Cílem práce bylo sledování cytostatického účinku a rozvoj rezistence u buněk T lymfomů v závislosti na dávce a délce působení PMEDAP. Metodika: Buňky CCRF-CEM byly kultivovány 5 týdnů v médiu RPMI+10% FCS bez anebo s PMEDAP (1 mmol/l; 10 mmol/l). XTT test byl dělán v intervalu 7 dnů po 24 a 72 hodinách kultivace v mikrodestičkách. Pro stanovení citlivosti buněk k PMEDAP byla použita testovací dávka této látky 1; 10; 100 mmol/l. Pro pokus in vivo byly použity lymfomy rostoucí na inbredních potkanech SD/Cub. 14 dní po sc injekci 10^6 buněk byl polovině zvířat 10 dnů aplikován PMEDAP (sc, 2xdenně, 5mg/kg). 24 hodin po poslední dávce následovala kultivace buněk izolovaných z léčených a neléčených lymfomů v 96-jamkových mikrodestičkách v médiu RPMI +ATB+10% FCS+růstové faktory. Po 48 hodinách kultivace byla XTT testem hodnocena proliferační aktivita nádorových buněk bez působení PMEDAP a po kultivaci s PMEDAP v koncentracích 50 a 10 μ mol/l.

Výsledky a závěr: Buňky pod stálým tlakem 1 μ mol/l PMEDAP měly po 21 dnech statisticky významně vyšší proliferační aktivitu oproti kontrolním buňkám (0 μ mol/l). Rezistence se vyvíjí v závislosti na dávce a čase. Dávka 1mmol/l PMEDAP, jež je 7x nižší než IC_{50} pro CCRF-CEM (7 mmol/l) umožnila rozvoj rezistence a naopak dávka 10 mmol/l byla již po 14 dnech cytotoxická. 10 denní působení PMEDAP in vivo nesnížilo citlivost buněk lymfomu k další dávce látky.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ - KLINICKÁ ČÁST

- 1. Fornůsková Daniela, 4.r., PŘF UK
- 2. Bajerová Jana, 5.r., PŘF UK
- 3. Havránek Štěpán, 5.r.
- 4. Hippman Radek, 3.r.
- 5. Kovařík Aleš, 5.r.
- 6. Křemen Jaromír, 5.r.
- 7. Pantelakis Linos, 6.r.
- 8. Rašlová Nina, 5.r., PŘF UK
- 9. Stebel Jakub, 3.r.
- 10. Šedý Jiří, 5.r.
- 11. Vaňková Zdenka, 5.r.
- 12. Votavová Hana, 6.r.
- 13. Zimová Kamila, 5.r.
- 14. Zogala David, 5.r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

Předseda: prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.

Člen: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

**BIOCHEMICKÉ PROJEVY MITOCHONDRIÁLNĚ KÓDOVANÉ MUTACE V MTATP6 GENU**

Autoři: Daniela Fornůsková, Ing. Markéta Tesařová, P. Ješina, A. Vojtíšková, H. Hansíková, J. Houštěk, J. Zeman
Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Systém oxidační fosforylace (OXPHOS), katalytická dráha tvořená pěti multipodjednotkovými komplexy zabudovanými ve vnitřní mitochondriální membráně, zajišťuje v buňce syntézu naprosté většiny ATP. Deficit komplexu V (ATP syntáza), způsobený prevalentními bodovými mutacemi mitochondriálně kódovaného genu *MTATP6*, je častou příčinou závažných mitochondriálních encefalomyopatií, manifestujících se syndromem NARP nebo Leighovým syndromem.

U chlapce s mitochondriální encefalomyopatií, laktátovou acidózou a mikrocefalií byla nalezena heteroplazmická delece 2 bp (9205delTA) *MTATP6* genu. Množství mutované mtDNA ve svalu (69%), fibroblastech (85%), krvi (68%) pacienta a v krvi matky (64%) bylo výrazně vyšší, než v krvi babičky (4%). V naší studii se snažíme objasnit funkční dopad mutace 9205delTA, která je v oblasti stop kodonu *MTATP6* genu, na systém OXPHOS.

Ve fibroblastech byla zjištěna snížená aktivita komplexu IV (cytochrom c oxidáza; reziduální aktivita 13%), snížená syntéza ATP a respirace stimulovaná ADP (pokles na 30 – 50%) a také nižší hodnota mitochondriálního membránového potenciálu ve stavu 4 (FACS analýza využívající TMPM sondu). Nativní elektroforéza (BN-PAGE) komplexů OXPHOS a dvourozměrná elektroforéza podjednotek jednotlivých komplexů ukázaly výrazné snížení obsahu komplexu V ve svalu a mírně snížené množství komplexu V ve fibroblastech. Žádné změny nebyly zaznamenány v množství ostatních komplexů respiračního řetězce. WesternBlot analýza s využitím monoklonálních protilátek proti a podjednotce ATP syntázy, ve shodě s nativní elektroforézou, nedetekovala ve svalu komplex V ani intermediáty vznikající při sestavování celého komplexu. Ve fibroblastech komplex V i intermediáty přítomné byly.

V současné době probíhají také studie na úrovni mRNA s cílem potvrdit hypotézu, že mikrolece narušuje posttranskripční procesy tvorby separátních mRNA-ATP8/ATP6 a mRNA-COXIII z původně polycistronního transkriptu a způsobuje tak vznik fúzní mRNA(ATP8/ATP6/COXIII).

Práce byla podpořena grantem VZ 1111 00003

KOURENÍ, TĚHOTENSTVÍ A PLOD

Autoři: Jana Bajerová (5. roč. PĚF UK), Nina Rašlová (5. roč. 1. LF UK)
Školitel: MUDr. Eva Králíková, CSc. - Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN

Úvod: kouření je významným rizikovým faktorem během těhotenství, a to nejen pro matku, ale i pro plod. Jedna z pěti nastávajících matek kouří, i s vědomím, že ohrožuje své dítě. Kouření se na patologickém průběhu těhotenství a vývoji plodu podílí mnoha mechanismy. Kouří-li žena v těhotenství, dochází často k růstové retardaci. Za nejvýznamější následky kouření matky patří zhoršená poporodní výživa (redukce kojení), vyšší riziko syndromu náhlé smrti, zvýšená respirační nemocnost a vyšší riziko zhoubných nádorů v dětském věku. Bohužel mezi našimi těhotnými kouří 20 %.

Metodika: Šetření jsme prováděly na poporodním oddělení Gynekologicko-porodnické kliniky 1.LF UK. Formou řízeného pohovoru jsme zjišťovaly data týkající se kouření v těhotenství, porodu i znalostí a názorů matek na vliv kouření v těhotenství na plod. Objektivizace kouření- měřením CO ve vydechaném vzduchu (za posledních 12 hodin).

Výsledky: z 263 dotázaných matek, které byly v období šestinedělí po porodu (většinou 2-3 dny) kouřilo pravidelně 13 matek, příležitostně 17 a 33 matek přestalo kouřit v těhotenství. Téměř polovina kuřáček ví, že kouření způsobuje nižší porodní hmotnost dítěte, ale 40% kuřáček vůbec neví, co si pod slovy o škodlivosti kouření na plod představit. Ani jedna kuřáčka nevěděla, že kouření způsobuje zpomalený růst a vývoj plodu.

Závěr: v našem souboru byla prevalence kouření vyšší, než se uvádí, znalosti matek o vlivu kouření na plod malé. Většina kuřáček by ráda přestala kouřit, převážná většina někdy zkusila přestat, ale neúspěšně.

QT DISPERZE U PACIENTŮ LÉČENÝCH DOSULEPINEM

Autor: Štěpán Havránek

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

QT disperze (QTd) je definovaná jako rozdíl nejkratšího a nejdelšího QT intervalu naměřeného v jednotlivých svodech určitého svodového systému. QTd je fyziologickým jevem, avšak nárůst hodnot QTd může být způsoben celou řadou příčin.

Je známo, že některá antidepresiva, zejména tricyklická, vykazují ve vyšších dávkách kardiotoxicitu jako jeden z nežádoucích účinků. Cílem této práce bylo zjistit, jestli u pacientů léčených profylaktickými dávkami dosulepinu existují změny QTd a popřípadě jestli jsou změny QTd závislé na plasmatické koncentraci dosulepinu.

K měření byly použity elektrokardiografické a vektorokardiografické záznamy a povrchové potenciálové mapy získané od 27 psychiatrických pacientů léčených dosulepinem a od 37 zdravých dobrovolníků. QTd byla vypočítána z QT intervalů naměřených v 80ti svodovém systému. U psychiatrických pacientů byly známé hodnoty plasmatické koncentrace dosulepinu.

Průměrné hodnoty QTd (\pm SD) u dosulepinové skupiny se ukázaly být signifikantně vyšší [$70(\pm 21)$ ms] než u skupiny kontrolní [$34(\pm 12)$ ms]. Závislost mezi plasmatickou hladinou dosulepinu a QTd byla také signifikantní ($p < 0,001$) při korelačním koeficientu 0,7871.

Navzdory faktu, že při výpočtu QTd z naměřených QT v 80ti svodovém systému, jsou výsledky velmi slibné, použití klasického 12ti svodového systému podobné závislosti neprokazuje.

KORUNKOVÉ A MŮSTKOVÉ MATERIÁLY NA BÁZI POLYMERŮ PO 2 LETECH

Autor: Radek Hippmann

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

Úvod: Stomatologická veřejnost hledá již léta ideální rekonstrukční materiál pro fixní protetiku, který by se barevně, pevností a trvanlivostí podobal přirozenému zubu. Jednu z možností tvoří techniky, kde fazetování je zajištěno plasty. Cílem naší studie bylo posoudit, jak odolávají tyto materiály v dutině ústní.

Metodika: Sestavili jsme soubor 50 korunek u 15 pacientů (4 žen a 11 mužů) s fazetami z plastu (C+B, Dentál) a kompozitního plastu (Sinfony, ESPE), se slitinami ušlechtilých kovů (Aurix, Safina) a obecných kovů (Wiron, Bego). Dva roky po zhotovení jsme korunky klinicky vyšetřili, otiskli jsme je adiční silikonovou hmotou (Aquasil, Detrey Dentsply) a v laboratoři jsme zhotovili repliky situace v dutině ústní. V elektronovém rastrovacím mikroskopu Jeol 5500 LV (Jeol) i klinicky jsme hodnotili stav okluze – okluzní reliéf, anatomický tvar, vestibulární a orální plochu korunky i oblast krčkového uzávěru.

Výsledky: Výsledky lze shrnout do následujících bodů. Okraj korunky je vestibulárně v úrovni marginální gingivy (14 %) pod (30,0 %) nebo nad ní (56 %). Není statisticky významný rozdíl v hodnocení vestibulární a orální plochy zubu. Při tomto typu sanace nacházíme ve 32 % zánětlivé změny v oblasti krčkového uzávěru. To s sebou nese zvýšené nebezpečí vzniku sekundárního kazu (14 %). Přítomnost sekundárního kazu i zánětlivé změny jsou v přímé korelaci s nepřesnou adaptací okraje korunky po 2 letech. Pouze u 68 % korunek jsme našli ideální stav, kdy se sonda nezachytává u okraje korunky. Korunky po dvou letech jsou převážně intaktní (98 %). Korunky, přestože měly stabilní anatomický tvar, měnily barvu fazety. Pouze 10 % prací vykazovalo optimální barevnou shodu s okolními vlastními zuby. V rastrovacím elektronovém mikroskopu jsou viditelné známky abraze.

Závěr: Na závěr lze říci, že korunkové a můstkové materiály na bázi polymerů jsou v našich ordinacích bezesporu metodou volby. Mechanické i chemické uspořádání vazby mezi kovovou slitinou a fazetou u kompozitních plastů je velmi stabilní. Nevýhodou materiálu přes kvalitní zpracování i leštění je neuzavření povrchu a možnost penetrace částic z potravy, kouření apod. Tato vlastnost se negativně projeví na mírném zabarvení fazety, případně ztrátě transparence materiálu.

TRANFÚZNÍ PRAXE U KRITICKY NEMOCNÝCH KARDIAKŮ

Autoři: Aleš Kovařík, Gabriela Dostálová

Školitel: MUDr. Jan Bělohávek, II. interní klinika - klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Podávání transfúzí u kriticky nemocných je časté a činí v průměru až 2 jednotky krve týdně. Doporučení, kdy transfuzi indikovat, jsou ale nejednoznačná. (Nejedná se o akutně krvácející pacienty). Většinou se řídíme arbitrárně stanovenou hladinou hemoglobinu v širokém rozmezí od 70 do 120 g/l. V posledních letech se ale objevilo několik prací, kriticky hodnotících praxi podávání transfúzí na intenzivní péči. Zdá se, že restriktivní politika podání transfúzí až při poklesu hemoglobinu na hodnoty kolem 70 g/l zlepšuje prognózu kriticky nemocných s výjimkou pacientů s akutními formami ischemické choroby srdeční.

Cíl studie: zhodnotit současnou praxi podávání transfúzí u kriticky nemocných kardiaků



Metody: retrospektivní analýza dokumentace pacientů hospitalizovaných na koronární jednotce, kterým byla podána krevní transfuze

Výsledky: za období 3/2001 – 12/2001 bylo hospitalizováno celkem 642 nemocných, 57 z nich byla podána transfuze. Průměrný věk transfundovaných byl 70 ± 8 let, z toho 32 nemocných (56 %) bylo hospitalizováno pro akutní formy ICHS. „Trigger point“ pro podání transfuze byl $88,5 \pm 7,5$ g/l, průměrně bylo podáno 3,4 (1-18) jednotky/pacienta/hospitalizaci, nejčastěji byly podány 2 j/pacienta/hospitalizaci. Mortalita transfundovaných činila 12,3 %, mortalita všech pacientů na KJ za poslední 3 roky činí 3,4 %.

Závěr: V současnosti používaný „trigger point“ pro podání transfuze kardiakům vyžadujícím intenzivní péči je 90 g/l, mortalita transfundovaných je významně vyšší. Podle nám známých údajů se jedná o první studii v české literatuře hodnotící transfúzní praxi u kriticky nemocných kardiaků.

OPOMÍJENÉ ASPEKTY RIZIKOVÉHO CHOVÁNÍ

Autor: Jaromír Křemen, 5. ročník 1 . LF UK

Školitel: doc. MUDr. Otakar Klein, CSC., Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Část výuky 5. ročníku na ústavu Hygieny a epidemiologie 1. LF UK v Praze je věnována tzv. terénní stáži, jejímž předmětem je seminář vedený mediky se studenty pražských středních škol zaměřený na prevenci HIV/AIDS a dalších pohlavních chorob. Součástí semináře je anketní šetření základních znalostí dospívající mládeže v této závažné problematice.

Metodika: Svě šetření jsem rozšířil o údaje získané svými kolegy v letech 2000-2003, čímž vznikl soubor 910 studentů 14 pražských středních škol ve věku 14-19 let, z toho bylo 303 studentů 4 gymnázií, 367 studentů 7 středních průmyslových škol, 161 studentů 1 střední zdravotní školy a 79 studentů 1 umělecké střední školy. Do souboru jsem vybral respondenty, kterým byly zadány shodné otázky. Anketa byla zaměřena na znalosti v problematice HIV/AIDS a dalších STD (způsoby přenosu, projevy onemocnění, ochrana před nimi, počty HIV pozitivních osob v ČR a ve světě).

Výsledky: Většina studentů našeho souboru vykazala znalosti o HIV/AIDS, kapavce a syfilis, avšak neměla znalosti o zdravotně závažné šířící se nákaze chlamydií trachomatid a viry hepatitidy typu C a B, i dalších STD jako jsou svrab, trichomoniáza, herpes genitális, mykózy a další STD. Za závažné považují zjištění, že malá část respondentů považovala za ochranu před šířením STD i hormonální antikoncepci a další neúčinné metody. Přibližně jen pětina respondentů uvedla jako možnost přenos infekce transplacentárně z matky na dítě či infikovanou jehlou, naopak někteří považují za rizikový i samotný dotyk s nemocným. 40 % respondentů neuvadlo žádný specifický příznak STD, pouze třetina studentů sledovaného souboru má představu o řádových počtech hlášených případů HIV/AIDS, jak ve světě, tak v ČR.

Závěr: Uvedené šetření poukázalo na minimální znalosti dalších zdravotně závažných STD, z nichž některé nabraly na významu zvláště v posledním desetiletí, a to chlamydiových infekcí a hepatitidy typu C, šířící se hlavně mezi intravenózními uživateli drog (promořenost této populace činí až 70 %). Tyto mezery ve znalostech těmito chorobami ohrožené dospívající mládeže je nezbytné vyplnit.

BIOLOGICAL WARFARE AND TERRORISM: THE REALITIES OF TODAY

Author: Linos Pantelakis

Advisor: prof. MUDr. Vladimír Becko DrSc., Institute of Hygiene and Epidemiology, Charles University in Prague - First Faculty of Medicine

Political developments in recent years, perhaps more than ever before, have brought the issue of biological weapons to the forefront of defense planning. The fear of a biological attack has spread globally and has already begun to influence public health and medical education in some countries. Indeed, healthcare specialists are major contributors to the public debate about the ways to prevent or protect societies against such threats. This presentation aims to summarize the existing information on the potentialities of current biological warfare systems, possible ways to defend against them, as well as some current controversies centered around the public health policies that should be adopted in that regard. Dividing this broad topic into three parts, we may initially conduct a quick review of the use of biological weapons throughout history, focusing especially on the tremendous developments in this field of military research - and its applications - during the 20th century. For although such forms of warfare have probably been used since the dawn of mankind, the morbidity and mortality caused by them since the second world war is incomparable to any previous era. The second part is devoted to the „current state of affairs“, namely a description of both the existing offensive and defensive systems in use. For the former, we analyze the conditions and process of weaponization, illustrated by some examples of biological warfare agents. As for the latter, we present the various possibilities for detection, barriers, containment and decontamination procedures, ranging from biological neutralization units on the battlefield to real-time epidemiological surveillance systems for great populations. Here we should also include a short mention of the international treaties and pacts (along with their legal or political

shortcomings) that aim to regulate or prohibit the use of these weapons. Finally, we discuss the society issues that are raised by the impact of the biological threat on health policy, such as the intrinsic efficacy and therefore the usefulness of defensive measures, their consequences on the allocation of healthcare funds, and the need to retain civilian democratic control of the structures and orientations of public health.

DLOUHODOBĚ PROVIZORNÍ ŘEŠENÍ U MLADÝCH PACIENTŮ PO 5 LETECH

Autor: Jakub Stebel

Školitel: doc. MUDr. Tat'jana Dostálová, DrSc., Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Ortodontická terapie nebo úrazy zubů u mladých pacientů jsou často spojeny s potřebou korigovat anomálie i proteticky. Rozvoj nových adhezivních technik, technologií i vlastních pracovních postupů dovoluje oddálit klasické protetické řešení a chránit zdravé zubní struktury. Cílem studie bylo objektivně zhodnotit kvalitu této terapie po 5 letech používání v dutině ústní.

Metodika: Výchozí klinickou skupinu tvořilo 20 pacientů (18 žen a 2 muži). Průměrný věk byl 21,5 let. Dlouhodobě provizorní sanaci jsme mohli rozdělit podle typu defektu na: korekci tvaru zubu, doplnění mezery a řešení poúrazové ztráty. Terapii jsme prováděli aplikací fazet z kompozitního materiálu Charisma (Heraeus Kulzer) přímo v ústech pacienta. Dále jsme zhotovovali dentapregové můstky (Ribbond) i adhezivní konstrukce z kovových slitin. Ve dvou případech jsme se rozhodli pro klasické fixní řešení (Vita Omega + Wiron, Bego).

Výsledky: Po 5 letech při kontrolním vyšetření jsme hodnotili stav sanace u 32 zubů podle následujících kritérií: kvalita marginálního okraje sanace, adaptace okraje, anatomický tvar korunky, přítomnost kazu, barevná stálost fazety, diskolorace okraje povrchu výplně – rekonstrukce, hladkost povrchu, citlivost po výkonu. I když ošetřené zuby vyhovovali a vyšetření pacienti sami nepožadovali úpravu, o stoprocentním stavu sanace můžeme mluvit pouze u korunek. Nejčastěji jsme detekovali porušený povrch sanace, často v kombinaci s diskolorací rekonstruované plošky. Změna anatomického tvaru s sebou přinášela odlomení plošky i zbarvení fazety. Celkový stav ošetření jsme zhodnotili jako velmi dobrý, zuby nebyly výrazně barevně ani tvarově změněné, adaptace okraje byla ve všech případech výborná, ve dvou případech jsme detekovali výskyt sekundárního kazu.

Závěr: Adhezivní techniky, které nevyžadují preparaci celého pilíře jsou bezesporu trendem moderní protetiky. Menší ztráta tvrdých zubních tkání, přirozený průběh abraze a s tím spojená změna v oblasti krčkového uzávěru by měla zajistit integraci nahrazené části zubu či mezičlenu do oblasti přirozeného chrupu. Při přísné kontrole kvality sanace bylo ve výborném klinickém stavu pouze polovina zubů. Dlouhodobě provizorní sanace vyžaduje optimální hygienu pacienta i pravidelné kontroly.

KLINICKÁ ANATOMIE PŘÍŠTÍTNÝCH ŽLÁZ

Autor: Jiří Šedý

Školitelé: MUDr. Ondřej Naňka, Anatomický ústav 1. LF UK, MUDr. Svatopluk Adámek, CSc., III. chirurgická klinika 1. LF UK a FNM

Úvod. Parathyroidektomie (PTE) je výkon, který klade značné nároky na zkušenost operátora. Poloha žláz a jejich počet je v 80 % konstantní, ale ve zbývajících 20 % může být zdrojem komplikací. Horní příštítné žlázy se obvykle nacházejí nad zkřížením a. thyroidea inferior (ATI) a n. laryngeus recurrens (NLR), zatímco dolní pod tímto křížením, většinou ventrálně od NLR. Naším cílem bylo (1) vypracovat optimální postup odběru příštítných žláz od dárců orgánů k transplantaci (2) optimalizovat operační postup při PTE.

Materiál a metodika. Studie byla prováděna na tělech zemřelých v Hlavově ústavu patologické anatomie 1. LF UK. Preparovali jsme společně s chirurgy 38 těl (18 žen, 20 mužů) ve věku 46 až 92 let. Příštítná tělíška jsme hledali nejprve na zkřížení ATI a NLR, následně na zadní ploše štítné žlázy, podél průběhu NLR a ATI, v krčních výběžcích thymu a v předním horním mediastinu. Tělíška jsme hodnotili makroskopicky i mikroskopicky.

Výsledky. Celkem jsme našli a odebrali 133 tělísek, která jsme identifikovali makroskopicky. Příštítná žláza byla nalezena v 75 %. Nejčastěji byla zaměněna za lymfatické uzliny (11%), lalůček štítné žlázy (9%), tukovou tkáň (3,75 %) a tkáň thymu (1,5 %). Mezi horními a dolními tělísky pravé a levé strany nebyl zaznamenán rozdíl v procentu úspěšnosti identifikace.

Diskuse. Nejdůležitějšími komplikacemi PTE jsou anatomické variety a možnost záměny příštítných tělísek za okolní útvary. Ve specializovaných centrech je udávána až 95% úspěšnost, což je více než v našem souboru (75%). Úspěšnost je dána použitím předoperačních zobrazovacích metod, které umožní lokalizovat až 80% tělísek. Kromě toho je preparace hypertrofických tělísek snazší.

Závěr. Ze studie vyplývají tato doporučení : Vypreparovat a šetřit NLR a pak nalézt jeho zkřížení s ATI - do vzdálenosti 2 cm kraniálně a kaudálně od tohoto místa leží většina tělísek. Pokud nejsou tělíška nalezena, preparovat dále ve vazivu podél průběhu ATI a NLR, na zadní ploše štítné žlázy, v tukové tkáni a v krčních



výběžcích thymu. Je třeba pamatovat na časté variety této krajiny. Návlek preparace v pitevně rozšiřuje zkušenost operátora.

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI Á-FODRINU

Autor: Zdenka Vaňková

Školitelé: RNDr. Ivana Janatková, prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc., MUDr. Karin Malíčková, Ústav imunologie a mikrobiologie 1.LF UK

Úvod. Sjögrenův syndrom (SS) je chronicky probíhající zánětlivé onemocnění postihující především exokrinní žlázy, jehož charakteristickými klinickými projevy jsou únava, xerostomie a xeroftalmie (sicca syndrom). Stanovit správnou diagnózu SS je poměrně obtížné, neboť žádný z dosud prováděných testů či stanovovaných laboratorních markerů není dostatečně specifický a/nebo senzitivní. V poslední době je možno využít v diagnostice SS vyšetření protilátek proti á-fodrinu (komponenta membránového skeletu), resp. jeho apoptotickému fragmentu. V této práci jsme sledovali výskyt těchto protilátek u jednotlivých skupin pacientů a v kontrolní populaci (viz níže) a jejich význam v diagnostice a patogenezi SS.

Metodika. Celkem bylo vyšetřeno 81 vzorků séra, jednalo se o séra pacientů se SS (skup.A, n=11), se systémovým nebo orgánovým autoimunitním onemocněním (skup.B, n=21), s ústním dyskomfortem (skup.C, n=18) a zdravé kontroly (skup.D, n=31). Protilátky proti á-fodrinu (ve třídě IgG a IgA) byly stanoveny metodou ELISA. Ostatní autoprottilátky byly stanoveny v rutinním provozu imunologické laboratoře.

Výsledky. Ve třídě IgG bylo zaznamenáno celkem 17 pozitivních výsledků (z toho 12 ve skup.B, 5 ve skup.D, žádný ve skup. A a C). Ve třídě IgA bylo jako pozitivní stanoveno 14 vzorků (žádný ve skup.A, 8 ve skup. B, 2 ve skup.C a 4 ve skup.D). Koncentrace autoprottilátek proti á-fodrinu u nemocných skup.A se statisticky nelišily od koncentrací ve skup.C a D.

Závěr. Z výsledků vyplývá, že k odhalení SS nestačí stanovení titru protilátek proti á-fodrinu. Tyto autoprottilátky však mohou mít ochrannou roli a přítomnost vysokých titerů by mohla nasvědčovat možnému poškození exokrinních žláz (slinných a slzných) v budoucnosti.

OPTIMALIZACE VYŠETŘENÍ PERMEABILITY ALVEOLOKAPILÁRNÍ MEMBRÁNY

Autoři: Hana Votavová, MUDr. Hana Jiskrová, doc. MUDr. Karel Kupka, CSc., J. Votruba, prof. MUDr. Martin Šámal, DrSc., Ústav nukleární medicíny 1.LF UK a VFN

Školitel: doc. MUDr. Karel Kupka, CSc., Ústav nukleární medicíny 1.LF UK a VFN

U intersticiálních plicních procesů a dalších plicních onemocněním vzrůstá permeabilita alveolokapilární membrány (PAM). Po inhalaci aerosolu ^{99m}Tc-DTPA (diethylentriaminopenta-octové kyseliny značené techneciem) ji lze měřit jako rychlost přestupu molekul DTPA z alveolární tekutiny do krve. Cílem práce byla optimalizace hodnocení výsledku vyšetření. Metodika. U 82 pacientů jsme po inhalaci aerosolu měřili pokles radioaktivity nad plicemi po dobu 30 minut. Hodnotili jsme přesnost odhadu měřených hodnot mono- a bi-exponenciální funkcí (MF, BF) a využitelnost vybraných parametrů křivek (poločasu T/2, rezidenčního času TR a normalizované reziduální aktivity NORA) pro diferenciaci typu onemocnění. Výsledky. Odhad měřených hodnot pomocí BF byl statisticky významně přesnější než odhad MF ($p < 0,01$). To odpovídá skutečnosti, že u většiny vyšetřených byla PAM patologicky zvýšená a radioaktivita v alveolech klesala již v průběhu vyšetření pod úroveň radioaktivity v krvi. Rozdíly mezi průměrnými hodnotami parametrů křivek ve skupině nemocných kryptogenní fibrotizující alveolitidou a jinými chorobami plic byly statisticky významné, jednotlivé hodnoty se však výrazně překrývaly. Nejlepší rozlišení obou skupin umožnily T/2 a NORA (standardní vzdálenost mezi průměrnými hodnotami 1,214 a 1,156 standardní odchylky). Závěr. Přestože BF lépe vystihuje měřené hodnoty ve sledovaném časovém intervalu, T/2 (MF) a NORA lépe popisují závažnost poruchy PAM.

PROJEKT PREVENTIVNÍ KARDIOLOGIE A ZDRAVÝ ŽIVOTNÍ STYL PRO ŽÁKY ZÁKLADNÍCH ŠKOL

Autoři: Kamila Zimová, Lenka Božanská

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

Úvod: Projekt prevence kardiovaskulárních onemocnění na základních školách (ZŠ) navazuje na loňský preventivní program zaměřený na skupinu středoškolských studentů. I tentokrát je cílem zlepšit informovanost žáků, dále prostřednictvím anonymních dotazníků zajistit data pro zpracování ukazatelů jako je prevalence kouření dětí věkové skupiny 11-16 let, zmapovat nakolik si žáci uvědomují zdravotní škodlivost kouření a nadužívání alkoholu, jaké jsou jejich motivace nekouřit, dokáží-li si již v tomto věku vytvořit pevné rozhodnutí stát se nekuřákem. Přesun projektu k mladším věkovým skupinám byl zvolen v důsledku faktu, že první cigarety bývají vykouřeny

mezi 11.–13. rokem života. Snahou je, aby si žáci z přednášek odnesli vědomí, že sami aktivně mohou do určité míry ovlivňovat svůj zdravotní stav, vnuknout jim odpovědnost za své vlastní zdraví, vzbudit zájem o získávání dalších informací a upozornit, že i v mladém věku je působení rizikových faktorů nezanedbatelné.

Metodika: Ve spolupráci s pedagogy ZŠ žáci 6.-9. tříd vyplnili úvodní dotazník o 16 otázkách, týkajících se znalostí škodlivosti kouření a zneužívání alkoholu, zjišťujících, zda byl již žák ve styku s cigaretou, alkoholem či drogami, jeho motivy nekouřit apod. Po vyhodnocení byl upraven obsah přednášek pro konkrétní třídy. Zpracovaná data jsme dali k dispozici i pedagogům, aby si tak mohli lépe zmapovat situaci na vlastní škole. Práci jsme zadali studentům 5. ročníku 1.LF UK v rámci terénní praxe stáže z hygieny. Byly probrány cíle projektu, osnova přednášek a možnost použití pomůcek pro zpestření hodin (barevných plakátů, měření TK či množství CO ve vydechaném vzduchu smokerlyzerem). V hodině studenti rozdali krátký dotazník s dotazy na prevalenci kouření, značky cigaret, vlivu reklamy.

Výsledky: Do termínu odevzdání abstraktu jsme navštívili 2 ZŠ. Z dotazníků vyplynulo, že v každé třídě několik žáků zkoušelo kouřit. V povědomí žáků je škodlivé působení kouření na plíce, v těhotenství a na celkový vzhled. Vliv na další orgány (srdce a cévy) si neuvědomují. Nejčastěji uváděné důvody proč nekouřit: finanční, strach z prozrazení, vliv na zdraví.

Závěr: Diskuze ve třídách se vždy spontánně rozběhla, žáci pokládali dotazy. Během března a dubna navštívíme další třídy a konkrétní výsledky budou prezentovány na konferenci.

PREVALENCE FAMILIÁRNÍHO HYPERALDOSTERONISMU V ČESKÉ REPUBLICCE

Autoři: David Zogala, A. Hořínek, Z. Lacinová, M. Hampf, R. Bernhardt, B. Štrauch, T. Zelinka, J. Widimský
Školitel: doc. MUDr. Jiří Widimský, CSc., III. int. klinika VFN Praha, MDC Berlin

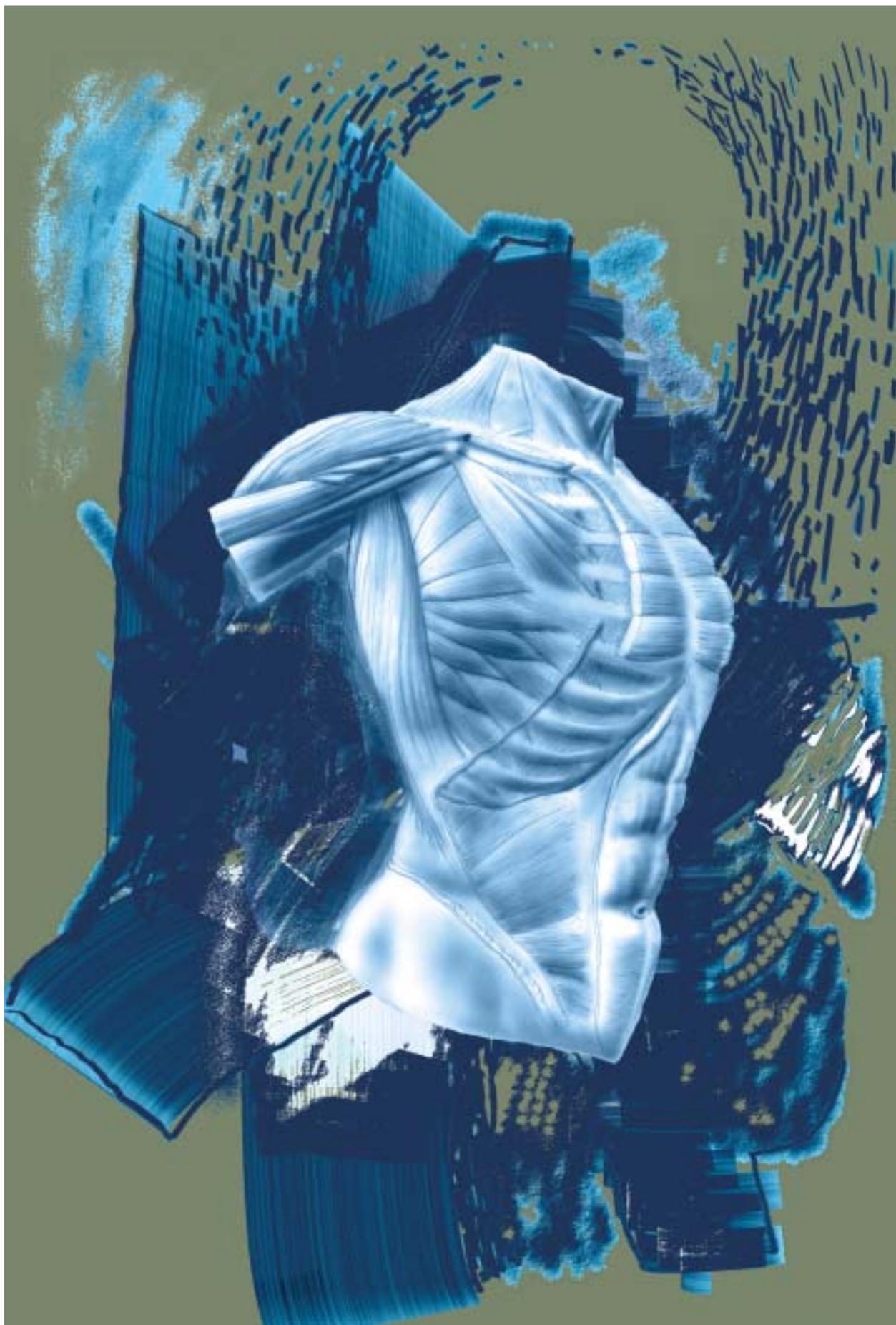
ÚVOD: Familiární hyperaldosteronismus (dále FH) je typ primárního hyperaldosteronismu (dále PH), podmíněný vznikem chimerického genu, který způsobuje patologickou regulaci tvorby aldosteronu hormonem ACTH. Klinicky se projevuje jako hypertenze středního až těžkého stupně.

CÍL PRÁCE: Cílem studie bylo pomocí níže uvedených metod určit prevalenci FH v populaci pacientů se středně těžkou až těžkou hypertenzí vyš. na III. interní klin. VFN.

METODY: Studie byla zpracována na souboru 422 pacientů (276 žen, 146 mužů, prům. věk 51 let) s hypertenzí. K potvrzení dg. PH byl použit nález nízkých koncentrací reninu (pod 0.7 ng/ml/h), zvýšených hladin aldosteronu (nad 150 pg/ml) a zejména poměru aldosteron/renin v plazmě > 50. K určení FH byla u pacientů s PH provedena genetická analýza pomocí PCR a elektroforézy. K odhalení jiných příčin sek. hypertenze byly použity běžné metody.

VÝSLEDKY: PH byl ve skupině nalezen u 97 pacientů z celkového počtu 422 osob (23%). FH byl gen. analýzou potvrzen u 3 pacientů se zjištěným PH (3% z PH, 0.7 % ze všech hyperteniků).

ZÁVĚR: FH je vzácnější formou PH. PH naopak je častou příčinou vysokého krevního tlaku u středně těžké až těžké hypertenze.



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ - PŘEDNÁŠKY

- 1. Beran Ondřej, MUDr.
- 2. Canová Nikolína, MUDr.
- 3. Halaška Michael, MUDr.
- 4. Honzík Tomáš, MUDr.
- 5. Chovanec Martin, MUDr.
- 6. Janatová Markéta, Mgr.
- 7. Krátká Zuzana, Mgr.
- 8. Krausová Klára, Mgr.
- 9. Lenčová Erika, MUDr.
- 10. Linková Lucie, MUDr.
- 11. Malík Radek, MUDr.
- 12. Mikšovský Martin, MUDr.
- 13. Podzimek Štěpán, MUDr.
- 14. Řadhous Ivo, MUDr.
- 15. Řasová Kamila, Mgr. PhDr.
- 16. Trnečková Lenka, Mgr.
- 17. Válek Martin, MUDr.
- 18. Veselá Kateřina, Ing.
- 19. Wittner Michal, Mgr., MUDr.
- 20. Záhoráková Daniela, Mgr.
- 21. Zakiyanov Oskar, MUDr.
- 22. Zanvit Petr, Mgr.
- 23. Zídková Kateřina, Mgr.
- 24. Zikán Michal, MUDr.

HODNOTITELSKÁ KOMISE:

předseda: prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
členové: prof. RNDr. František Vítek, DrSc.
doc. MUDr. Drahomíra Křenová, Csc.

**ROLE AKTIVOVANÝCH MAKROFÁGŮ V INTRATEKÁLNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚDI U BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDY****Autoři:** Ondřej Beran, Michal Holub, Jarmila Hnyková, Marie Staňková, Alena Lobovská**Školitel:** doc. MUDr. Marie Staňková, CSc., III. klinika infekčních a tropických nemocí 1. LF UK a FN Na Bulovce

Meningeální makrofágy (mf) představují první linii obrany CNS při bakteriální infekci. Jejich role spočívá v prezentaci bakteriálních antigenů a produkci cytokinů, které mnohonásobně zesilují imunitní odpověď při bakteriální meningitidě. Cílem naší studie byla analýza počtu mf v likvoru, jejich aktivovaných forem a hladin cytokinů v likvoru ve vztahu ke klinickému průběhu akutní bakteriální meningitidy.

Metodika. Do studie bylo zařazeno 10 pacientů přijatých na JIP infekční kliniky s akutní bakteriální meningitidou. Lumbální punkce (LP) byly provedeny v den přijetí a v odstupu 3-5 dní.

Relativní a absolutní počty mf a jejich exprese aktivačního markeru HLA-DR byly vyšetřeny trojbarevnou průtokovou cytometrií, analýza hladin cytokinů v likvoru byla provedena pomocí metody cytometric bead array (CBA); rutinně byly stanoveny biochemické ukazatele v likvoru a v periferní krvi. Tíže průběhu onemocnění byla stanovena pomocí skóre SOFA a APACHE II.

Výsledky. Vysoké relativní zastoupení aktivovaných mf v likvoru negativně korelovalo se SOFA skórem ($r = -0,928$, $p < 0,02$) a sérovým CRP ($r = -0,928$, $p < 0,02$). Při kontrolní lumbální punkce sledované ukazatele již nevykazovali statisticky významné korelace. Dále jsme pozorovali významné zvýšení hladiny zánětlivých cytokinů v likvoru z 1. LP, zejména IL-1b, IL-6, IL-8 a TNF- α .

Závěr. Naše výsledky naznačují pozitivní roli aktivovaných meningeálních mf s expresí antigenu HLA-DR v imunitní obraně CNS při bakteriální meningitidě. Stanovení aktivovaných mf v likvoru může tedy sloužit jako užitečný prognostický marker této infekce. Pro analýzu cytokinů v likvoru je vhodnou metodou CBA, kterou lze stanovit hladiny šesti cytokinů v minimálním množství vzorku.

VLIV SPONTÁNNÍ PRODUKCE OXIDU DUSNATÉHO NA FUNKČNÍ A METABOLICKOU AKTIVITU POTKANÍCH HEPATOCYTŮ V KONVENČNÍ A PERFUNDOVANÉ PRIMÁRNÍ KULTURE**Autor:** Nikolina Canová**Školitel:** prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc., Farmakologický ústav 1.LF UK

Úvod: Izolace hepatocytů (HC) vede vlivem působení EGTA, kolagenázy a tzv. stříhového napětí ke strukturálním změnám architektury jater a ke stresu, který indukuje expresi II.typu NO-syntázy (iNOS) v HC. V důsledku přetrvávající aktivity iNOS i v nestimulovaných primárních kulturách HC dochází ke zvýšené produkci oxidu dusnatého (NO). Proto jsme se v naší studii zaměřili na stanovení a vyhodnocení vlivu spontánní i modifikované produkce NO na funkčně/metabolickou kapacitu a buněčnou integritu HC v konvenční a perfundované tkáňové kultuře.

Metody: HC byly izolovány z potkaních jater standardní dvoufázovou perfuzní metodou, poté nasazeny na Petriho misky (PM) a do vnitřního prostoru deskového membránového bioreaktoru (DMB), dále kultivovány buď na jedné vrstvě nebo jako sendvič mezi dvěma vrstvami kolagenu a v případě DMB navíc promývány kompletním médiem bez nebo s přidavkem jedné z imunopresivních látek, prednisolonu či cyklosporinu A (CsA). Během následujících 2-3 dnů byly v daných časových intervalech odebírány vzorky ke stanovení hladin nitritů, ury, ALT a CsA (HPLC) v médiu.

Výsledky: V konvenční i perfundované kultuře překrytí HC druhou vrstvou kolagenu (sendvičový model) signifikantně snížilo produkci NO a vyplavování ALT z HC a současně významně zvýšilo syntetickou aktivitu buněk. Také prednisolon, který je znám pro svoji schopnost inhibovat expresi iNOS, vedle očekávaného snížení hladin NO stimuloval biosyntézu ury v HC. Perfuze HC v DMB dále zefektivnila metabolismus CsA a navíc nám umožnila sledovat v reálném čase pozitivní působení CsA na biosyntézu ury a na modulaci hladin NO.

Závěr: Monitorováním hladin NO v různých fázích a podmínkách kultivace jsme prokázali, že spontánně produkovaný NO negativně působí na funkční a metabolickou aktivitu HC. Podávání vhodných inhibitorů iNOS již během izolace a v prvních dnech kultivace HC by tak mohlo vedle využití sendvičového modelu a perfuze primárních kultur přispět k udržení vyšší funkční kapacity a stupně diferenciaci HC v průběhu nejen krátkodobých ale i dlouhodobých in vitro studií.

Podpořeno granty IGA MZ NL 7418/3, GAČR 305/00/1129 a J13/98:11110002.

LYMFEDÉM - POOPERAČNÍ KOMPLIKACE OPERACE PRO KARCINOM PRSU A MULTIFREKVENČNÍ BIOELEKTRICKÁ IMPEDANČNÍ ANALÝZA JAKO DIAGNOSTICKÁ METODA.**Autoři:** MUDr. Michael Halaška, doc. MUDr. Dana Marešová, V. Komárek, MUDr. Petra Benedová**Školitel:** doc. MUDr. Dana Marešová, CSc., Fyziologický ústav 1. LF UK

Úvod

Lymfedém je patologické nahromadění extracelulární tekutiny vedoucí k postupné fibrotizaci. Incidence se uvádí mezi 6-30%, kdy klinické důsledky pro pacientku představují pocit těžkosti končetiny, bolestivost, poru-

chu funkce, časté záněty. Vyšetřovacími metodami jsou měření obvodu končetiny, měření objemu pomocí vytlačené kapaliny, tonometrií, CT, PET, Scinti vyšetřením. Novou metodou k měření extracelulární tekutiny a tedy lymfedému je multifrekvenční bioelektrická impedanční analýza (MFBIA).

Metoda a materiál

Pacientky indikované k operaci pro karcinom prsu jsou změřeny pomocí MFBIA a měřením obvodu končetiny 1 den před operací a následně v 2 měsíčních intervalech po dobu 24 měsíců. Testovaná skupina je porovnána s kontrolní skupinou. Sledovány jsou zároveň rozdíly v závislosti na provedeném typu lymfadenektomie: ALND x SLNB x Sampling.

Výsledky

Prezentovány jsou průběžné výsledky detekce lymfedému a metodika měření.

CARNITINES PROFILE DURING FOETAL AND EARLY POSTNATAL PERIOD

Authors: MUDr. Tomáš Honzik, P. Chrastina, RNDr. Hana Hansikova, CSc, M. Böhm, doc. MUDr. Richard Plavka, CSc, MUDr. Miloš Zapadlo, CSc, prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.

Advisor: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Department of Paediatrics and Neonatology and Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Carnitines play an important role in the transport of long-chain fatty acids across mitochondrial membranes and their profile in blood cells and body fluids reflect fatty acid metabolism. The aim of our study was *a) to compare two methods* for carnitine measurement and *b) to characterise the differences* in concentrations of FC (free carnitines), TC (total carnitines) and AC (acylcarnitines) in term and premature neonates.

Material: The citrate-blood samples from umbilical cord from 35 term newborns and 28 premature neonates and their blood spots obtained by heel-stick puncture on the postnatal day 4-6 (term newborns) and on the postnatal day 7-9 (premature neonates) were analysed.

Methods: FC, TC and AC were measured by electrospray-tandem mass spectrometry (MS/MS) and by radioenzymatic method.

Results: In full term newborns, the concentration of FC, TC and the ratio FC/TC were significantly lower and the ratio AC/FC were significantly higher on the postnatal day 4-6 in comparison with cord blood. In premature neonates the ratio FC/TC were significantly higher and the concentration of AC and ratio AC/FC were lower on the postnatal day 7-9 in comparison with levels in cord blood. The carnitines concentration evaluated by radioenzymatic method in plasma in full-term and premature neonates were lower compared with MS/MS method. Using radioenzyme method, negative correlation was observed between the levels of FC, TC and AC in cord blood and gestational age and birth weight ($P < 0.05$). Using MS/MS method, positive correlation was observed between FC and ratio FC/TC and gestational age and birth weight ($p < 0.05$). In premature neonates, no correlation was found between levels of carnitine and the amount of maternal milk intake.

Conclusions: Higher concentration of carnitines in premature neonates than in term newborns probably result from higher maternal carnitines concentration during earlier stage of gestation. The investigations of whole blood by tandem mass may be more appropriate due to indispensable intraerythrocytic carnitine pool and may give more information about carnitine stores than measurement only plasmatic pool by radioenzymatic method. MS/MS represent a powerful method for neonatal screening of inborn errors of metabolism.

This work was supported by IGA 6555/3, UK 1/2002/C and VZ 64165

DIFERENCIAČNĚ PODMÍNĚNÝ CHARAKTER SIALYLACE DLAŽDICOBUNĚČNÝCH EPITELŮ A KARCINOMŮ HLAVY A KRKU

Autor: MUDr. Martin Chovanec

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

prof. MUDr. Jan Betka, DrSc., Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF a FNM

Dlaždicobuněčné epitely hlavy a krku představují morfologicky a funkčně stratifikovaný typ tkáně. Proces maligní transformace buněk těchto epitelů v dlaždicobuněčné karcinomy je doprovázen řadou genotypových a fenotypových alterací, které umožňují těmto buňkám maligní chování. Cílem této studie bylo stanovit, typ vazby kyseliny sialové (á2,3/á2,6), zdravých dlaždicobuněčných epitelů sliznic hlavy a krku a jejich maligních protějšků.

Vzorky normálních dlaždicobuněčných epitelů, dlaždicobuněčných karcinomů a jejich regionálních metastáz byly zpracovány technikami imunohistochemie, lektinové histochemie a reverzní lektinové histochemie. Bylo užito techniky dvojitého značení s užitím rostlinných lektinů, *Sambucus nigra* lektin (SNL), *Maackia amurensis* lektin typ 2 (MAL2), jejich endogenních glykokonjugátů a monoklonálních protilátek proti panelu cytokeratinů.

Buňky studovaných normálních epitelů exprimovaly kyselinu sialovou vázanou v pozici á2,6 v oblasti stratum basale. á2,3-vázaná kyselina sialová byla detekována suprabasálně a v řadě případů i ve stratum basale. Typ



vazby sialových kyselin v diferencovaných oblastech dlaždicobuněčných karcinomů byl analogní suprabasálním vrstvám normálních epitelů. Málo diferencované oblasti těchto nádorů vykazovaly vazbu kyseliny sialové v pozici á2,6. Vazba sialových kyselin v metastazujících buňkách z regionálních lymfatických uzlin odpovídá špatně diferencovaným oblastem primárních nádorů. Ve vyšetřovaných tkáních nebyla detekována vazebná místa pro kyselinu sialovou v pozici á2,3/á2,6.

Sialové kyseliny jako součástí většiny endogenních glykokonjugátů sehrávají roli v řadě biologicky významných specifických interakcí zprostředkovaných receptory a jejich ligandy. Charakter vazby kyseliny sialové v normálních dlaždicobuněčných epitelech hlavy a krku je diferenciačně podmíněný a tudíž topologicky determinován. Kvantitativní a strukturální aberace sialových kyselin během patologických stavů, včetně procesu maligní transformace, může zásadním způsobem ovlivňovat specifické interakce mezi buňkami samými, buňkami a extracelulární matrix, jakož i jiné biologické a patologické fenomény. Glykobiologická charakterizace může významně přispět k porozumění procesům epiteliální diferenciace a progresu dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku.

SOMATICKÉ MUTACE GENŮ *BRCA1* A *BRCA2* U SPORADICKÉHO KARCINOMU PRSU

Autor: Mgr. Markéta Janatová

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

Karcinom prsu je v naší ženské populaci nejčastějším zhoubným nádorem. Příčinou většiny dědičných karcinomů, které představují 5-10% případů onemocnění, jsou zárodečné mutace genů *BRCA1* a *BRCA2*. Kromě inaktivující mutace závisí vývoj nádoru i na ztrátě druhé, intaktní alely *BRCA*. U většiny karcinomů prsu, které vznikají v nepřítomnosti dědičné mutace, se úloha genů *BRCA1/BRCA2* jeví jako omezená. Ztráty alel v lokusech *BRCA1* a *BRCA2* jsou sice častým nálezem, somatické mutace příslušných genů se však podařilo prokázat jenom v ojedinělých případech.

V naší studii jsme se zaměřili na analýzu mutací genů *BRCA1/2* u 23 neselektovaných vzorků karcinomu prsu. Screening zahrnoval kódující úseky genů a byl prováděn pomocí PTT (protein truncation test) analýzy, která detekuje převažující alterace charakterizované zkrácením genového produktu. K potvrzení a charakterizaci mutací bylo použito sekvenování vhodných fragmentů PCR. Analýza genetického materiálu získaného z periferní nesrážlivé krve sloužila k odlišení zárodečných mutací. Ztráta heterozygosity intragenových nebo v blízkosti genu ležících markerů byla využita k určení výpadku alel *BRCA1/2*.

Ztráta alely *BRCA1* byla prokázána u 4 nádorových vzorků (17%), ztráta alely *BRCA2* pak u 6 nádorů (26.1%). Jediná inaktivující mutace byla nalezena při analýze DNA s výpadkem alely v lokusu *BRCA1*. Detekovaná delece guanosinu 3981 (3981delG) v exonu 11 genu *BRCA1* vede k ukončení translace na kodonu 1306 (L1306X) a zkrácení genového produktu. Genová alterace nebyla prokázána v genetickém materiálu získaném z periferní krve. Jedná se o zatím nepopsanou somatickou mutaci genu *BRCA1*. Při analýze DNA s výpadkem alely *BRCA2* byl nalezen transkript tohoto genu s delecí exonu 12. Vysvětlení, zda se jedná o alternativní genový sestřih nebo o důsledek inaktivující genové mutace, vyžaduje sekvenční analýzu prováděnou na úrovni genomové DNA.

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

VYUŽITÍ METODY ELISPOT K DETEKCI PRODUKCE CYTOKINŮ U PACIENTŮ S ČASNOU PARODONTITIDOU

Autoři: ¹Mgr. Zuzana Krátká, ¹Mgr. Klára Krausová, ²Opatrná J., ¹Bártová J., ¹Výzkumný ústav stomatologický, 1. LF a VFN, ²Ústav experimentální botaniky, ČAV, Praha

Školitel: RNDr. Jiřina Bártová, CSc., Výzkumný ústav stomatologický, 1. LF a VFN

ELISPOT (Enzyme linked immunosorbent spot) je moderní metoda, která umožňuje detekci jednotlivých buněk produkujících cytokiny (spotů) po jejich specifické aktivaci antigenem. Cílem studie bylo zjistit počet buněk produkujících IL-4, IFN-gama, IL-6 a IL-10 po mitogenní a bakteriální stimulaci u pacientů s časnou parodontitidou, u jejich sourozenců a u zdravých kontrol použitím metody ELISPOT.

Bylo vyšetřeno 10 pacientů s časnou parodontitidou (ve věku 22 – 37 let), 3 zdraví sourozenci pacientů a 7 zdravých dárců. Mononukleární buňky byly izolovány z periferní krve, poté byly kultivovány při 37°C a 5% CO₂ po dobu 3, 5 a 7 dní. Ke stimulacím byl použit Pokeweed mitogen (PWM Sigma, 2 mg/ml), Pokeweed mitogen + Concanavale A (PWM 2ug/ml + ConA, Sigma 10mg/ml), usmrčené bakterie *E.coli* (10⁸bb/ml), *A. actinomycetem-comitans* (10⁸bb/ml) a *Porphyromonas gingivalis* (10⁸bb/ml). Stimulované buňky byly nanášeny na desky ELISPOT (Diacclone, Francie) a po další inkubaci byly buňky lyzovány a byla provedena detekce spotů. Desky byly snímány barevnou CCD kamerou, snímky byly analyzovány systémem LUCIA G (Laboratory Imaging, Praha).

U pacientů s časnou parodontitidou byl po mitogenní stimulaci zjištěn vyšší počet buněk produkujících IL-4 a IL-10 a nižší počet buněk produkujících IL-6 a IFN-gama. Signifikantně vyšší počet buněk produkujících IL-10 byl zjištěn po stimulaci *A.actinomycetemcomitans* u pacientů v porovnání se zdravými jedinci (nepárový Studentův t-test, $p=0,05$). Po stimulaci *P.gingivalis* a *E.coli* bylo aktivováno méně buněk než v nestimulovaných kulturách, nicméně i zde byl zjištěn vyšší počet buněk produkujících IL-4 a IL-10 a naopak nižší počet buněk produkujících IFN-gama a IL-6 než u zdravých osob. Tyto výsledky potvrdily současný model rozvoje parodontitidy, který předpokládá, že u jedinců vnímavých ke vzniku onemocnění způsobují bakterie zubního plaku aktivaci zejména Th2 lymfocytů, kdežto u jedinců odolných bakterie aktivují převážně Th1 lymfocyty. Závěrem můžeme konstatovat, že metoda ELISPOT se osvědčila jako vhodná metoda pro sledování imunitní reakce.

Tato studie byla finančně podporována grantem Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 6742-3.

VLIV BAKTERIÍ ZUBNÍHO POVLAHU NA LIGATUROU VYVOLANOU EXPERIMENTÁLNÍ LÉZÍ PARODONTU U POTKANŮ KMENE FISHER .

Autoři: Mgr. Klára Krausová K., Bártová J., Otčenášková M., Krátká Z., doc. MUDr. Otokar Krejsa, CSc., Jana Dušková, Výzkumný ústav stomatologický, 1.LF UK a VFN

Školitel: RNDr. Jiřina Bártová, CSc., Výzkumný ústav stomatologický, 1. LF a VFN

Úvod: Parodontitida je chronické zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubů, které bývá častou příčinou jejich ztráty. Patologické změny jsou charakterizovány resorpcí alveolární kosti, zánětem dásní a přítomností bakterií zubního povlaku, z nichž jsou u pacientů za patogeny považovány zejména *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a *Porphyromonas gingivalis*. Jejich patogenita byla potvrzena experimentálně u bezmikrobních (germ-free) potkanů. Výsledky několika experimentálních studií u pokusných zvířat prokázaly příznivý vliv imunizace proti patogenům zubního povlaku. Imunizace však může navodit u některých zvířat naopak destrukci parodontu.

Cíl: V naší studii sledujeme vliv bakterií *Actinobacillus actinomycetemcomitans* izolovaných ze zubního povlaku na ligaturou navozené léze parodontu u potkanů kmene Fisher.

Metodika: Experimentální léze parodontu byla vyvolána ligaturou založenou do sulku kolem prvního moláru u jednoho potkana. Po třech týdnech byl potkan utracen a bakterie přítomné na ligatuře namnoženy. Pomocí selektivní půdy byl detekován a namnožen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, který byl následně použit k intragastrické imunizaci u 8 potkanů s ligaturou. Imunizace byla provedena třemi dávkami sonikátu bakterií opakovaně podávanými po týdnu.

Výsledky: Změny na parodontu po třech týdnech působení ligatury byly hodnoceny radiograficky a zánětlivé změny v měkkých tkáních histologicky.

PREVALENCE KAZU ČASNÉHO DĚTSTVÍ - PRŮŘEZOVÁ STUDIE STAVU ORÁLNÍHO ZDRAVÍ PĚTILETÝCH DĚTÍ V ČR.

Autoři: MUDr. Erika Lenčová, doc. MUDr. Zdeněk Broukal, Jana Dušková, L. Mrklas

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

Úvod: V letech 1998 a 2001 proběhla v České republice celostátní průřezová studie stavu chrupu pětiletých dětí. Jejím cílem bylo zhodnotit stav orálního zdraví pětiletých dětí v ČR a určit prevalenci kazu časného dětství ve vyšetřené populaci dětí.

Metodika: Vyšetřování proběhlo v mateřských školách ve 46 náhodně vybraných lokalitách v České Republice. Lokality byly vybrány Statistickým úřadem ČR pro účely orálních epidemiologických studií v roce 1987. Do studie byly zahrnuty děti starší než 4 roky a mladší než 5 let. V roce 1998 bylo vyšetřeno celkem 435 dětí a v roce 2001 celkem 321 dětí. Klinické nálezy byly zpracovány do standardních ukazatelů kazivosti a stavu chrupu: počet zubů s kazem - dt, kazivost - dmft, průměrná hodnota kazivosti 30% dětí s nejhorsími hodnotami kazivosti - SiC, stupeň ošetření - ri.

Výsledky: Zpracovaná data: 1998: dt - 2,51, dmft - 3,68, SiC - 7,71, ri- 25,30, % dětí bez zubního kazu - 26,70; 2001 - dt - 2,33, dmft - 3,32, SiC - 7,28, ri- 28,00, % dětí bez zubního kazu - 31,30. Autoři formulovali epidemiologickou definici kazu časného dětství jako nejméně jeden horní řezák s kazem a dft horních dočasných řezáků vyšší než dft horních dočasných molárů. V roce 1998 bylo 37,3 % vyšetřených dětí postiženo kazem časného dětství, v roce 2001 to bylo 21,1, což je signifikantní pokles.

Závěr: Riziko vzniku zubního kazu se u horních řezáků liší od ostatních segmentů mléčného chrupu. Proto se signifikantní pokles postižení horních řezáků zubním kazem neprojevil rovněž snížením celkové prevalence zubního kazu v populaci pětiletých dětí. v Praze 17. 02. 2003

ZÁVISLOST MNOŽSTVÍ PATOLOGICKÝCH LOŽISEK V MOZKU U NEMOCNÝCH S NEUROPSYCHIATRICKÝM LUPUSEM NA VĚKU.

Autoři: ¹MUDr. Lucie Linková, ²Peterová V., ³Zvárová J., ¹Olejárová M., ²Seidl Z., ²Daneš J., ¹Dostál C., ¹Revmatologický ústav 1. LF UK, Praha; ²MR oddělení Radiodiagnostické kliniky, 1. LF UK, Praha; ³EuroMISE Centrum, Karlova Univerzita a Akademie věd ČR, Praha.

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

Studie vyhodnocuje závislost patologických nálezů v MR nálezech v mozku u nemocných s neuropsychiatrickým lupusem (NPSLE) na věku.

Pacienti a metodika: 60 nemocných s NPSLE a 54 zdravých kontrol jsme prospektivně vyšetřili pomocí 1,5 T MR v T1 vážených, T2 vážených a flow attenuation inversion recovery (FLAIR) sekvenci, nativně a postkontrastně. V obou souborech byla spočítána četnost patologických ložisek v bílé hmotě hemisfér a byla korelována s věkem vyšetřených osob. Soubory byly rozděleny na 3 věková pásma: 18 - 39, 40 - 49 a 50 - 59 let. Pro statistické srovnání souborů byla použita klasická analýza rozptylu a kovariance i Freeman-Tukeyho transformace.

Výsledky: pozorovali jsme převahu hypersignálních ložisek v T2 vážených obrazech ve frontálních a následně parietálních lalocích obou hemisfér, v povodí několika mozkových tepen. Ložiska nejčastěji dosahovala velikosti do 3mm a jevila výraznou subkortikální převahu. Jejich podkladem je vaskulopatie, resp. vaskulitida drobných cév s mikrotrombózou a gliózou. Průměrný počet ložisek u nemocných s NPSLE v 1. věkové skupině byl 5,18, v 2. věkové skupině 4,5 a 8,42 ve 3. skupině. Celkově bylo ložisek zjištěno průměrně 23,6. Průměrné četnosti ložisek se významně lišily jak v jednotlivých věkových skupinách u nemocných s NPSLE, tak i mezi oběma soubory ($p < 0,001$).

Závěr: průměrné počty patologických ložisek v jednotlivých mozkových lalocích patrných v MR nálezech vykazují u nemocných s významnou závislost na věku (na 0,1% hladině významnosti) a nejvyšší četnost jsme zaznamenali ve věkové skupině 50 - 59 let, kde se nejspíše přidává nárůst ložisek v bílé hmotě i z jiné etiologie (akcelerovaná ateroskleróza, arteriální hypertenze, vliv léčby apod.).

Práce vychází z výzkumného záměru MZČR 0000023728 Revmatologického ústavu a z výzkumného záměru CEZ J13/98: 1111.0000.1 - 206016 Neurologické kliniky.

¹MR Department, Radiodiagnostic Clinic, ^{1st}Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic;

²Institute of Rheumatology, ^{1st} Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic.

³EuroMISE Centre of Charles University and Academy of Sciences CR, Prague, Czech republic.

The study evaluates the age dependence of the pathological findings in the cerebral lobes in neuropsychiatric lupus (NPSLE) patients visible on magnetic resonance (MR).

Patients and methods: 60 NPSLE patients were investigated by 1,5T MR in T1 and T2 weighted images (T1W, T2W) in modes: spin-echo (SE), ultra-turbo spin-echo (UTSE, TSE) and flow attenuation inversion recovery (FLAIR). The pathological supratentorial white matter lesions were visually counted and correlated with the age of the patients. The patients were divided to the age groups: 18 - 39, 40 - 49 and 50 - 59 years. The classical analysis of dispersal or covariance including Freeman - Tukey transformation was used.

Results: we observed the hypersignal focal lesions predominantly in frontal and parietal regions of both hemispheres in all NPSLE patients, significantly pronounced in FLAIR mode. The most frequent size of the lesions was 3mm. MR detectable signal changes are supposed to be caused by the vasculopathy or vasculitis of cerebral arterioles with microthrombosis and gliosis. The patients were divided to the age groups: 18 - 39, 40 - 49 and 50 - 59 years. The average number of foci in the I st age group was 5,18 in the I st age group; 4,5 in the II nd one and 8,42 in the III rd one. The numbers of foci in all 4 cerebral lobes differ significantly also among each other in our NPSLE patients ($p < 0,0001$).

Conclusions: average numbers of MR foci in NPSLE patients in the cerebral lobes show the significant age dependency. All our patients age groups differ on 0,1% level of significance.

The work follows from the research projection CEZ J13/98: 1111.0000. 1 - 206016 of Neurological clinic, ^{1st} Medical faculty Charles university in Prague and the research projection MZČR 0000023728 od Rheumatologic institute in Prague.

PROF. ZVÁROVÁ:

V práci vycházím z mé hypotézy:

U jednotlivých souborů nemocných (SLE, RS, K) se liší průměrný počet supratentoriálních ložisek uložených souhrnně i v jednotlivých věkových skupinách.

Řešení: ve výsledcích statistického zpracování I jsme testovali rozdíly v průměrných hodnotách pomocí analýzy rozptylu na 5% hladině významnosti. Zjistili jsme významný rozdíl mezi průměrnými počty supratentoriálně uložených ložisek podle diagnóz jak v celé skupině (bez rozdělení podle věku), tak i v jednotlivých věkových skupinách.

Re: adjustace podle věku je nutná, po adjustaci se tři srovnávané skupiny průkazně liší na 5% hladině ($p < 0,001$).

DIPEPTIDYLPEPTIDÁZA IV A AKTIVITOU A/NEBO STRUKTUROU HOMOLOGNÍ MOLEKULY (DASH) V NEUROEKTODERMÝCH NÁDOROVÝCH LINIÍCH

Autor: MUDr. Radek Malík

Školitel: prof. MUDr. Aleksí Šedo, DrSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1.LF UK

Dipeptidylpeptidáza IV (DPP-IV; EC 3.4.14.5) zastává významnou úlohu v procesech buněčné proliferace, diferenciaci, nádorové transformaci, orgánově specifického metastázování a apoptózy. V současnosti bylo popsáno a charakterizováno několik dalších, v některých případech s DPP-IV nehomologních, molekul s podobnými enzymovými vlastnostmi a rovněž několik vysoce homologních, avšak enzymově neaktivních proteinů. Buněčně specifický vzorec těchto „DPP-IV strukturálně nebo aktivitou podobných molekul“ (DASH) s podobnými, ale nikoliv identickými vlastnostmi, je významným, byť dosud jen částečně prozkoumaným fenotypovým rysem. Neuroektodermální buňky patří z hlediska exprese a funkce DASH molekul k dosud nejméně probádaným.

Expresí jednotlivých DASH molekul byla studována na úrovni mRNA (RT-PCR), proteinu (western blotting, gelová filtrace, gradientová elektroforéza) a enzymové aktivity (pH optima, substrátová preference, inhibiční profil).

Naše výsledky prokázaly různé spektrum zastoupených DASH molekul v jednotlivých liniích gliomových (U87, U373, U138, Hs683, T98G) a melanomových (SK-MEL-1, SK-MEL-28, Hs294T) buněk. V některých buněčných liniích jsme prokázali přítomnost atraktinu, avšak identifikace zbylých DASH molekul dosud není dokončena. Expresí jednotlivých DASH molekul je též specificky regulována v podmínkách deprivace růstových faktorů.

Provedli jsme charakterizaci expresního vzorce DASH molekul v gliomových a melanomových buněčných liniích. Přestože není charakterizace ukončena, lze konstatovat, že expresní vzorec se liší u jednotlivých linií a je specificky regulován v podmínkách deprivace růstových faktorů.

LÉČBA INICIÁLNÍ KAZIVÉ LÉZE PRINCIPY MINIMÁLNÍ INTERVENENCE – AIR ABRASIVNÍ TECHNIKY PREPARACE.

Autor: MUDr. Martin Mikšovský

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

Cíl: Tato práce je součástí autorova tématu postgraduálního studia. Jejím cílem je průkaz účinnosti použití nových přístrojů v terapii iniciální kazivé léze.

Metodika: Ke studii používáme přístroj RONDOflex firmy KaVo. Jde o zařízení pracující na principu air abraze (sandblasting). Podstatou této techniky je otryskávání povrchu léze krystaly Al_2O_3 o velikosti 27 μm . Působením jejich kinetické energie jsou z ložiska kazu odstraňovány infikované částice. Výhodou metody je maximální ochrana zdravých zubních tkání. Na základě informovaného souhlasu byli do studie zařazeni pacienti s pozitivním vztahem k orálnímu zdraví, u nichž je vysoká pravděpodobnost možnosti pravidelného sledování výsledků ošetření. Precizně diagnostikované kazivé léze byly ošetřeny výše popsaným způsobem a výsledné kavity byly zaplněny flow kompozitním výplňovým materiálem. U pacientů sledujeme časovou náročnost ošetření, subjektivní bolestivost při výkonu a v pravidelných intervalech i stabilitu výplně a tvorbu případného sekundárního zubního kazu. Na extrahovaných zubech sledujeme in vitro pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu povrchy stěn kavit po preparaci air abrazivními technikami a srovnáváme je se strukturou povrchů vytvořených standardním použitím rotačních preparačních nástrojů.

Výsledky: V otázce časové náročnosti preparace byl u většiny pacientů zjištěn její nárůst ve srovnání s použitím klasických rotačních nástrojů. Nárůst činil v průměru 10%. Tato skutečnost je však do značné míry kompenzována nulovou bolestivostí během preparace. Není tedy nutno aplikovat lokální anestezii a výsledný čas ošetření se vyrovná standardním technikám a v některých případech se dokonce zkrátí. V případě stability výplně a vzniku sekundárního zubního kazu jsou naše výsledky zatím pouze krátkodobé a po půlročním sledování je kvalita jejich okrajového uzávěru nezměněna a sekundární zubní kaz není u 100% ošetřených pacientů přítomen.

Závěr: Z dosud zjištěných výsledků studie se minimálně intervenční ošetření kazivé léze pomocí air abrazivních přístrojů jeví jako vysoce efektivní a komfort ošetření zvyšující metoda. Její použití je minimálně stresující pro pacienta a maximálně ergonomické pro lékaře.

IMUNITNÍ REAKCE U OSOB PROFESNĚ EXPOZOVANÝCH RTUTI

Autoři: Štěpán Podzimek, Jarmila Procházková, Jiřina Bártová, Jana Nerudová, Zdena Čábelková

Školitel: MUDr. Jarmila Procházková CSc., Výzkumný ústav stomatologický 1. LF UK a VFN

Úvod: Profesionální expozice těžkým kovům může u vnímavých jedinců negativně ovlivňovat imunitní reakce. Změněná imunitní reakce pak může vést k mnoha zdravotním problémům.



U vybrané skupiny profesně exponovaných osob bez viditelných zdravotních obtíží, pracovníků elektrolytické výroby chlóru, jsme sledovali in vitro reaktivitu lymfocytů stimulovaných solemi kovů a v supernatantu po stimulaci lymfocytů tvorbu interferonu gama a autoprotilátek proti jaderným antigenům.

Metodika: Reakce na kovy byla diagnostikována metodou proliferace lymfocytů modifikovanou pro kovy (Melisa®). V supernatantech tkáňových kultur lymfocytů bez stimulace antigenem a po stimulaci chloridem rtuťnatým jsme metodou Elisa sledovali in vitro tvorbu interferonu-g a autoprotilátek proti jaderným antigenům.

Výsledky: Více než 40% profesně exponovaných osob reagovalo na zinek, rtuť a hliník. Při porovnání reakce lymfocytů u osob reagujících a nereagujících na rtuť bylo zjištěno, že lymfocyty osob se zvýšenou imunitní reakcí na rtuť tvoří více interferonu-g a méně autoprotilátek proti jaderným antigenům.

Závěr: Z výsledků vyplývá, že u osob reagujících v testu Melisa® na rtuť je patrně negativní působení rtuti dobře kompenzováno. U osob nereagujících v testu Melisa® na rtuť dochází k nižší tvorbě interferonu-g a k vyšší tvorbě autoprotilátek proti jaderným antigenům, což může svědčit pro zvýšenou profesní zátěž organismu kovy a lymfocyty těchto pracovníků již nemusí projevovat zvýšenou aktivitu po stimulaci kovy in vitro.

HISTORIE A SOUČASNOST STUDIA ZMĚN CÉVNÍHO ZÁSOBENÍ U IDIOPATICKÝCH STŘEVNÍCH ZÁNĚTŮ. JSOU CÉVNÍ ZMĚNY DŮSLEDKEM ČI PŘÍČINOU IDIOPATICKÝCH STŘEVNÍCH ZÁNĚTŮ?

Autoři: MUDr. Ivo Rathous, doc. MUDr. Milan Lukáš, CSc., D. Kachlík, Z. Uchytíl

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

Rozbor dostupné literatury ukáže způsoby a výsledky prováděných výzkumů změn cévního zásobení střeva u idiopatických střevních zánětů v minulosti a současnosti. Jsou 2 období, ze kterých se vyskytují tyto práce. První období 70tá léta minulého století a druhé období přelom století. Obě období mají rozdílný výsledek především v pohledu na příčinu a důsledek změn cévního zásobení střeva.

NEUROREHABILITACE U NEMOCNÝCH S ROZTROUŠENOU ŠKLERÓZOU MOZKOMISNI PRÍSPÍVA K FUNKČNÍM ADAPTAČNÍM ZMĚNÁM V MOZKU.

Autoři: Mgr. PhDr. Kamila Řasová, Doležal O., Krásenský J., Havrdová E., Obenberger J., Seidel Z., Zálišová M., Štykarová, P.

Školitel: As. MUDr. Eva Havrdová, CSc., Neurologická klinika 1.LF UK a VFN

Přestože je RS chronické zánětlivé onemocnění, které vede k demyelinizaci až axonální ztrátě, bylo prokázáno, že remisi provází funkční adaptační změny v mozku (Reddy, 2000; Ciffeli 2002). K těmto změnám u nemocných po CMP přispívá neurorehabilitace (Johansen-Berg, 2002). V této studii jsme se pokusili prokázat, že i u nemocných s RS neurorehabilitace přispívá k funkčním adaptačním změnám v mozku.

U experimentální skupiny byl před a po terapii hodnocen vliv neurorehabilitace na klinický stav a kvalitu života nemocných (Multiple Sclerosis Functional Composite, Barthel Index, Enviroment Status Scale, Modified Fatigue Impact Scale, Beck Self Scale, Multiple Sclerosis Quality of Life) a na mozkovou aktivitu (amplituda signálu v PMO, SMO, putamen, nc. dentatus pomocí fMRI). Pomocí statistické analýzy bylo posuzováno, zda změny klinického stavu souvisí se změnami mozkové aktivity. Změny experimentální skupiny byly porovnávány se změnami kontrolních skupin (skupinou nemocných, kteří nepodstoupili neurorehabilitační program a skupinou zdravých lidí).

V této práci byl potvrzen pozitivní vliv cílené neurorehabilitace na klinický stav a kvalitu života nemocných s RS. U exepimentální skupiny došlo k významnému zlepšení všech sledovaných klinických parametrů, zatímco u kontrolní skupiny nedošlo k významným změnám. Klinické změny byly provázeny změnami mozkové aktivity, pouze v LPMO, LSMO a P putamen byly významné. Přestože neurorehabilitace experimentální skupiny nebyla zacílena na zlepšení funkce ruky, ale na kontrolu řízení celého těla, došlo ke zlepšení jemné motoriky, chůze i kognitivních funkcí. I u mozkové aktivity byl naznačen trend k celkové reakci: zvýšila-li se amplituda signálu v mozkové oblasti při provádění paradigmatu levou rukou, zvýšila se i při provádění pravou (nc. dentatus, $p=0,008$).

V této práci byl potvrzen pozitivní vliv cílené neurorehabilitace na klinický stav a kvalitu života nemocných s RS. Klinické zlepšení bylo provázeno změnou mozkové aktivity – neprokázali jsme však statistickou významnost souvislost.

SLEDOVÁNÍ ZMĚN V EXPRESI GENU ČASNÉ ODPOVĚDI V MOZKU POTKANA V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ TRVÁNÍ IMOBILIZAČNÍHO STRESU

Autor: Mgr. Lenka Trnečková

Školitel: doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF UK a Universitat Autonomas de Barcelona, Spain

Vystavení organismu stresovým podnětům (stresorům) vyvolává výrazné narušení homeostázy. Tyto změny se mohou projevit v expresi genů časné odpovědi, z nichž jeden se označuje jako c-fos. Zajímalo nás, jak se mění exprese tohoto genu v závislosti na délce trvání imobilizačního stresu ve vybraných oblastech mozku potkana.

Pro pokusy jsme použili potkany kmene Sprague-Dawley. Pokusy byly provedeny podle platných předpisů o zacházení se zvířaty. Imobilizační stres byl aplikován po dobu 15, 60, 120 nebo 180 min. Po ukončení imobilizace byla zvířata usmrčena a odebrány mozky, které byly nakrájeny na kryostatu na řezy o síle 30 mm. Intenzitu změn v množství mRNA jsme sledovali metodou hybridizace in situ na řezech za použití radioaktivně značené sondy pro mRNA c-fos. Intenzitu reakce jsme sledovali vyhodnocením optické denzity na exponovaných filmech, odpovídající sledované oblasti mozku.

Zjistili jsme, že imobilizační stres ovlivňuje expresi c-fos v závislosti na oblasti mozku a délce trvání působení stresoru. V prefrontální kůře a laterálním septu jsou hodnoty nejvyšší po stresu trvajícím 15 min. V paraventriculárním jádru, střední části amygdala a v locus coeruleus dosahuje genová exprese maxima mezi 15 a 60 min-trvajícím stresu. Studium dynamiky genové exprese c-fos umožnilo nalezení nejvhodnějšího časového intervalu pro sledování dalších stresových parametrů u potkanů, včetně stresového ovlivnění kognitivních funkcí.

CÉVNÍ PŘÍSTUPY PRO HEMODIALÝZU: ANALÝZA STAVU

Autor: MUDr. Martin Válek

Školitelé: doc. MUDr. Sylvie Sulková, DrSc., doc. Ing. František Lopot, CSc., Interní oddělení Strahov 1. LF UK a VFN Praha

Úvod: Cévní přístupy jsou nutným předpokladem hemodialyzačního léčení. Dle Dialysis Outcomes Quality Initiative Guidelines je primární volbou nativní arteriovenózní fistule (AVF). Dle literatury však i více než 50% cévních přístupů tvoří umělohmotné náhrady. Situace v České republice není známa. Práce by se měla stát podkladem pro další dlouhodobější sledování.

Soubor a metody: Studie se zabývá cévními přístupy pacientů zařazených do pravidelné hemodialyzačního programu na našem pracovišti k 1.1.2003. Soubor tvoří 104 pacientů ve věku 26 – 90 let (průměr 64,5 let). Délka dialyzačního léčení byla mezi 2 měsíci a 28 lety (průměr 4,0 roku). Diabetes mellitus mělo 25% pacientů.

Výsledky: K 1.1.2003 byly cévními přístupy u 87,5% nativní AVF, u 7,7 procent AV zkratků s polytetrafluorethylenovým graffem, u 3,8% permanentní a u 1,0% dočasný centrální žilní katétr. Dvacet procent pacientů mělo zaniklou jednu nebo více AVF, průměrně 1,5. U ostatních pacientů je současná AVF jejich první. Průměrná funkčnost zaniklých AVF byla 30,4 měsíců, přičemž nebyl zaznamenán rozdíl mezi diabetiky a nediatetiky (30,9 vs. 30,3 ns). U 49% současných AVF nebyl proveden žádný intervenční zákrok. U zbývajících 51% bylo provedeno 78 perkutánních transluminálních angioplastik a 12 chirurgických zákroků (průměr 1,8 zákroků na jednu AVF).

Závěr: U našich pacientů je dominantním cévním přístupem nativní AVF. Polovina dialyzačních zkratků potřebuje ke své dlouhodobé funkčnosti intervenční zákroky. Studie ukazuje, že s využitím včas indikovaných intervenčních zákroků, je možno u velké většiny pacientů docílit dlouhodobé funkčnosti nativních AVF.

DEFICIT CYTOCHROM C OXIDÁZY A MUTACE V GENU SCO2

Autoři: Ing. Kateřina Veselá, Hana Hansíková, Markéta Tesařová

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman DrSc., Centrum Integrované Genomiky a KDDL, 1. LF UK

Úvod: Mitochondriální poruchy energetického metabolismu představují heterogenní skupinu onemocnění se závažným postižením funkce CNS, svalů a srdce, které jsou nejčastěji způsobeny poruchou komplexu cytochrom c oxidázy (COX). COX je kódována řadou mitochondriálních i nukleárních genů, v poslední době bylo popsáno i několik nukleárních genů nezbytných pro správnou assemblaci komplexu. Cílem naší práce byla snaha zjistit frekvenci mutací v asemblačním genu SCO2 u dětí s COX deficiencí a dále analyzovat vztah mezi genotypem a fenotypem.

Metodika: V souboru 30 dětí s biochemicky potvrzenou COX deficiencí byly mutace v SCO2 genu nalezeny u šesti dětí ze čtyř rodin. Mutace v SCO2 genu jsme analyzovali metodou přímého sekvenování na automatickém sekvenátoru ALFexpress. Nalezené mutace byly potvrzeny pomocí RFLP.

Výsledky: Mutaci G1541A v SCO2 genu v homozygotní formě, která vede k záměně glutamové kyseliny v pozici 140 za lyzin (E140K), jsme našli u pěti dětí ze tří rodin. U všech dětí se po 3-6 měsících normálního



psychomotorického vývoje rozvinula infantilní encefalopatie, atrofie mozku, těžká hypotonie, progredující dyspnoe a laktátová acidóza. Ani u jednoho z těchto dětí neprokázalo echokardiografické vyšetření postižení myokardu. Všechny šest dětí zemřelo ve věku 8-15 měsíců pod obrazem respirační insuficience. Ve čtvrté rodině bylo zjištěno, že postižený chlapec je v genu *SCO2* složený heterozygot pro již uvedenou mutaci G1541A mutaci, a pro mutaci C1280T, která vede ke vzniku stop kodonu na úrovni glutaminu 53 (Q53X). U tohoto chlapce se respirační insuficience objevila ihned po narození a echokardiografické vyšetření prokázala těžkou hypertrofickou kardiomyopatii. Chlapec zemřel již ve věku 7 týdnů.

Závěr: *SCO2* gen kóduje měd-transportující protein, který vnáší Cu_A do podjednotky II cytochrom c oxidázy. U všech výše popsaných pacientů vedly mutace v *SCO2* genu k poruše aktivity COX. Klinický projev se však lišil u nositelů homozygotní formy mutace od nositele složené heterozygotní mutace C1280T / G1541C. V souladu s ojedinělými literárními údaji heterozygotní forma C1280T / G1541C vedla k rozvoji hypertrofické kardiomyopatie, kdežto u homozygotů G1541A se rozvíjela těžká infantilní encefalopatie bez postižení myokardu.

Práce vznikla s podporou projektu IGA NE 6555-3.

SPATIAL ORIENTATION IN ALTITUDE SICKNESS

Authors: Mgr. MUDr. Michal Wittner, Pavel Říha

Advisors: prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc., doc. MUDr. Dana Marešová, CSc., Charles University in Prague First Faculty of Medicine, Physiology Department

To enable a better understanding of learning and memory, we investigated the spatial orientation in the altitude sickness model. Male Wistar rats aged 30 days were exposed to 60 minute lasting altitude hypoxia equivalent to 7000 meters (23000 feet) prior to solving the allothetic navigation task in the Morris water maze with submerged platform. The first memory test session was performed about 15 minutes after descent to near sea level conditions. In addition to measuring escape latencies, we calculated training efficiency as a percentage of successful swims.

The post-hypoxic group performed significantly better in the navigation task compared with the sham-treated animals (the mean difference of escape latencies was 8 seconds; $P = 0.0011$, two-way ANOVA, group \times session). The experimental group achieved remarkably higher efficiency in finding the submerged platform especially the first three days after the hypoxic stress as well ($P = 0,0113$, two-way ANOVA, group \times session). During the following training sessions the difference in escape latencies remained unchanged in favor of the post-hypoxic group, while the efficiency of both groups progressively converged. The navigation task was repeated three month after the exposition to the hypoxic stress with the following results: the escape latencies of both groups were similar, while the post-hypoxic group demonstrated again higher efficiency in solving the task ($P = 0.038$, two-way ANOVA, group \times session).

The results show the short-lasting altitude hypoxia enhances the performance of rats in the allothetic navigation task. Our findings are consistent with several studies suggesting that the transient hypoxic stress improves performance in memory tasks based mostly on visual perception.

MUTATION ANALYSIS OF *MECP2* GENE IN PATIENTS WITH RETT SYNDROME FROM CZECH AND SLOVAK REPUBLICS

Authors: Mgr. Daniela Záhoráková, Robert Rosipal

Advisors: Doc. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Center for Integrated Genomics and Department of Pediatrics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Background: Rett syndrome (RTT) is an X-linked severe neurodevelopmental disorder affecting almost exclusively girls with 1/15,000 frequency worldwide. It is caused by mainly *de novo* mutations in the ubiquitously expressed methyl-CpG-binding protein 2 gene (*MECP2*). MeCP2 protein contains two main functional domains, an N-terminal methyl-CpG-binding domain (MBD), followed by a transcriptional repression domain (TRD). It binds specifically to CpG-methylated DNA and is thought to act as a global transcriptional repressor. There are 5 prevalent mutations known in the *MECP2* that cause RTT. Four of them are detectable by restriction analysis. We report mutation analysis of 51 patients, all girls, with clinical diagnosis of RTT from Czech and Slovak Republics.

Methods: Genomic DNA was used to amplify coding sequence and exon/intron borders of *MECP2* gene. Products were examined by restriction analysis and automatic direct sequencing.

Results: The analysis revealed 15 different disease-causing mutations in 38 sporadic patients (75%). Three of them have not been previously published: a missense mutation - P302S, a small deletion of 3 bp - 1069delAGC and the deletion of 172 bp along the insertion of 41 bp - 1063del172bp+ins41bp. Nineteen patients had missense mutations (R106W, R133C, K135E, T158M, R306C), fourteen patients carried nonsense mutations (Y141X, R168X, S204X, R255X, R270X, R294X) and two had frameshift mutations (806delG and 1157del41bp).

Conclusion: Our results facilitate the diagnosis of RTT at the molecular level in the Slavonic population and provide insight into the molecular pathology of Rett syndrome.

Supported by grants from GACR 301/01/P068 (D.Z., R.R) and MSMT-LN00A079 (P.M.)

VLIV PROPUSTNOSTI PERITONEA NA VYLUČOVÁNÍ SODÍKU A TEKUTIN U PERITONEÁLNĚ DIALYZOVANÝCH PACIENTŮ

Autoři: MUDr. Oskar Zakiyanov, Vítězslav Kříha

Školitel: doc. MUDr. S. Sulková, DrSc., Interní oddělení Strahov, 1. LF a VFN

Úvod: Běžné hodnocení účinnosti peritoneální dialýzy (parametr Kt/Vurea a celková clearance kreatininu) nepostihuje bilanci Na a vody. Studie srovnává odstraňování vody a Na v závislosti na propustnosti peritonea stanovené peritoneálním ekvilibračním testem (PET) a na reziduální diuréze.

Metodika: U 28 pacientů (13 Ž, 15 M, věk 34-81 let, median 51 let) léčených metodou kontinuální ambulantní peritoneální dialýzy (CAPD) bylo provedeno 48 vyšetření, kdy byl souběžně vyšetřen PET, odpady Na v dialyzátu a moči, objem ultrafiltrátu a diuréza. Podle výsledků PETu byli pacienti zvláště posuzováni ve 4 skupinách s různou propustností peritonea (H, HA, LA, L). Pro bilanci Na byla uvažována změna koncentrace Na ve vypouštěném dialyzátu vůči výchozí koncentraci.

Výsledky: Odpad sodíku v dialyzátu narůstá úměrně množství peritoneálního ultrafiltrátu ($r=0,94$), ($p<0,05$), přičemž není patrný rozdíl mezi jednotlivými skupinami podle propustnosti peritonea.

Ve skupinách s vyšší propustností peritonea (H+HA) byla ultrafiltrace nižší a současně tak narůstal význam reziduální diurézy pro vylučování Na. Při nižší propustnosti peritonea (L+LA) pacienti odstraňovali tekutinu (a tím i Na) přednostně cestou peritoneální ultrafiltrace. Nebyla nalezena závislost mezi vylučováním sodíku močí a dialyzátem. U anurických pacientů s nízkou ultrafiltrací hrozí retence tekutin a Na.

Závěr: Odstraňování vody a Na peritoneální dialýzou je při zvýšené propustnosti peritonea nižší a adekvátní bilance je proto závislá na reziduální diuréze.

ADJUVANTNÍ EFEKT BAKTERIE *BACILLUS FIRMUS* PŘI IMUNIZACI INAKTIVOVANÝM CHRÍPKOVÝM VIREM CESTOU RESPIRACNÍHO TRAKTU.

Autoři: Mgr. Petr Zanvit, Havlíčková M.*, Táčner J.*, Chalupná P., Novotná O., Prokešová L.,

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

Úvod: *Bacillus firmus* (BF) je nepatogenní G+ bakterie vnějšího prostředí, u které byly prokázány, a to jak u myši, tak i u lidí, imunostimulační vlastnosti. Stimuluje makrofágy a lymfocyty a zvyšuje protiinfekční a protinádorovou imunitu. Jeho adjuvantní aktivita byla potvrzena při slizniční imunizaci bílkovinným antigenem. Slizniční imunita je primární v obraně proti chřipce. Parenterální imunizace nevyvolává slizniční imunitu. Slizniční vakcinace mrtvým virem není obvykle dostatečně účinná. Testovali jsme možnosti zvýšení imunitní odpovědi proti chřipkovému viru slizniční imunizací inaktivovaným virem za použití BF jako adjuvants.

Metodika: Imunizovali jsme BALB/c myši intratracheálně inaktivovaným chřipkovým virem typu A nebo B nebo komerční subjednotkovou vakcínou proti chřipce. Jako adjuvants jsme použili formolem inaktivovaný BF nebo delipidovaný BF (DBF). Imunitní odpověď jsme vyhodnotili testováním hladin protilátek v séru, bronchoalveolárních lavážích a střevních výplachích (ELISA), blastickou transformací splenocytů (inkorporace ^3H thymidinu) a lokální produkcí cytokinů v plicích (RT-PCR).

Výsledky: Při slizniční imunizaci samotným inaktivovaným chřipkovým virem nedocházelo k dostatečné imunitní odpovědi. Jestliže jsme použili BF nebo DBF v kombinaci s virem, dosáhli jsme výborné protivirové protilátkové odpovědi – a to systémové i slizniční a detekovali jsme slabou specifickou buněčnou odpověď. Adjuvantní efekt DBF byl lepší než BF. Ochranný efekt imunizace proti chřipkové infekci je v současné době studován. Slizniční imunizace subjednotkovou vakcínou s DBF nebyla při použití našeho imunizačního schématu účinná.

Závěr: BF a DBF se ukázaly jako potenciální adjuvantia pro imunizaci inaktivním chřipkovým virem cestou respiračního traktu. Nedostatečná imunogenita subjednotkové vakcíny poukazuje na důležitost lipoproteinového obalu při slizniční odpovědi.

DETEKCE VARIABILITY V REGULAČNÍCH OBLASTECH APOLIPOPROTEINU(A)

Autor: Mgr. Kateřina Zídková

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

Cílem postgraduální práce je pokračovat ve výzkumu genetické variability genů se vztahem k rozvoji aterosklerotických onemocnění. Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí v západní společnosti. Vývoj aterosklerózy je závislý na celé řadě exogenních a endogenních faktorů. Jedním z nejvýznamnějších endogen-



ních rizikových faktorů se ukázala být zvýšená hladina lipoprotein(a) [Lp(a)], jehož fyziologická funkce nebyla doposud objasněna. Koncentrace lipoprotein(a) je téměř pod výhradní kontrolou jediného lokusu, kterým je gen kódující apolipoprotein(a) [apo(a)]. Snahou tohoto projektu je odhalit míru variability v regulačních oblastech jmenovaného genu. Existence relativně častých mikrovariant regulačních oblastí apo(a) genu a jejich odlišná kombinace u různých jedinců, by mohla do značné míry vysvětlovat rozsáhlou variabilitu v hladině apo(a), respektive Lp(a), mezi jedinci.

Pro analýzu regulačních oblastí apo(a) genu bude užito molekulárně genetických metod (PCR, DGGE, RFLP, fragmentační analýza). Vlastní DNA analýze předcházela práce s NCBI databázemi. Pro výběr primerů, restriktivního enzymu a pro charakterizaci teplotních domén u analyzovaných fragmentů bylo použito příslušných programů. Fragmenty označené za nositele variability, na základě DGGE, budou osekvenovány za účelem jejího potvrzení. Změněná sekvence bude otestována v příslušné databázi na přítomnost vazebného místa.

Variabilita o významné frekvenci v regulačních oblastech apo(a) genu by podporovala hypotézu, že rozsáhlý rozptyl v hladině Lp(a) je u různých jedinců do značné míry určován odlišnou efektivitou transkripce apo(a) genu. V případě odhalení takovýchto potencionálně významných polymorfizmů se do budoucna počítá s otestováním jejich vlivu na míru transkripce za účelem vybrání funkčních variant. Varianty regulačních oblastí či jejich kombinace zvyšující expresi apo(a) genu by měly u svých nositelů zvyšovat riziko předčasných infarktů. Jejich znalost by tak umožňovala presymptomaticky určit jedince se zvýšeným rizikem rozvoje aterosklerotických onemocnění.

ANALÝZA MUTACÍ GENŮ BRCA1 A BRCA2 – IDENTIFIKACE RIZIKOVÝCH PACIENTEK S KARCINOMEM OVARIA

Autor: MUDr. Michal Zikán

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

Karcinom ovaria je u nás na sedmém místě ve frekvenci výskytu zhoubných nádorů u žen, je ovšem onemocněním s velmi vysokou úmrtností. V rámci hereditárních syndromů se vyskytuje karcinom ovaria často ve spojení s karcinomem prsu.

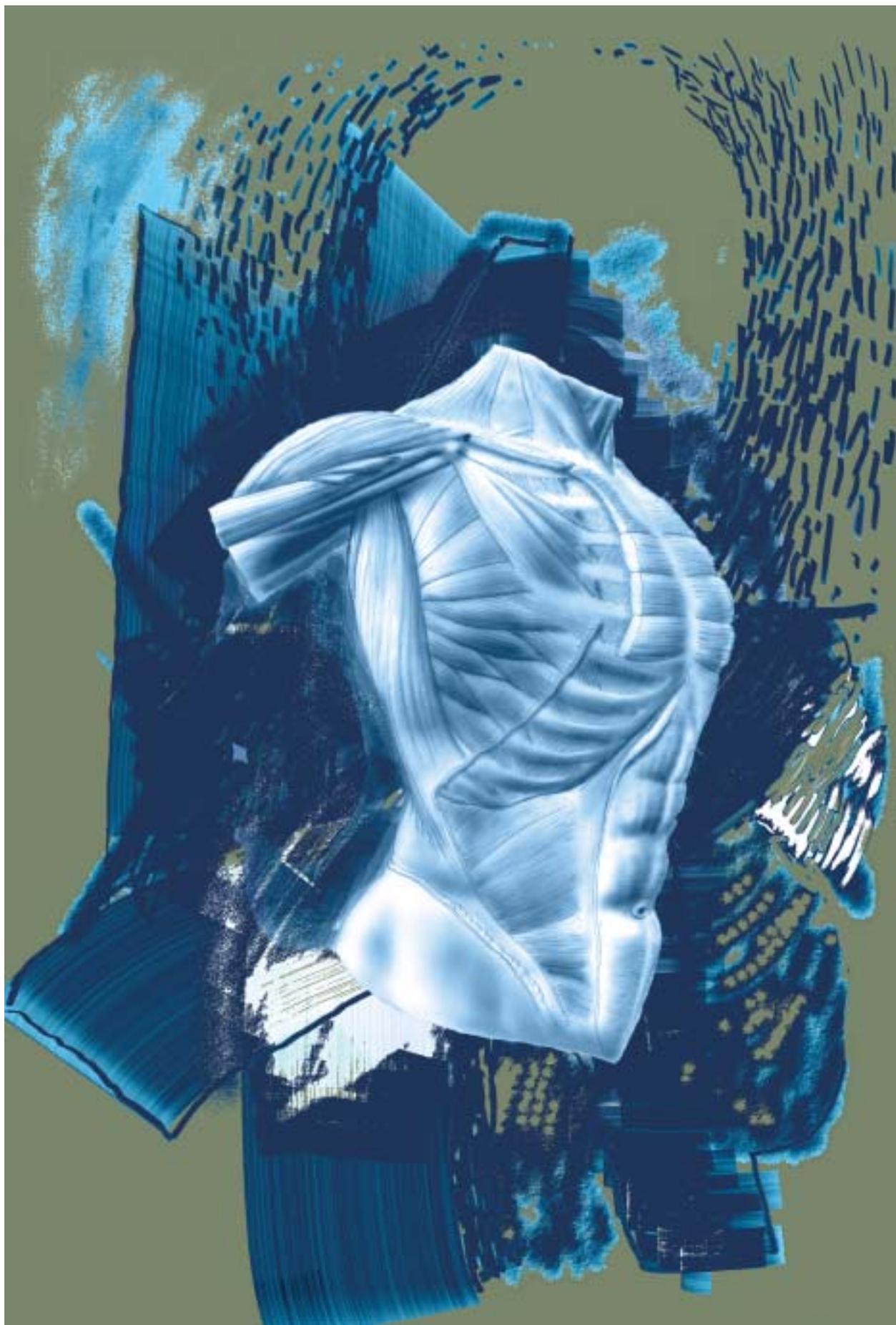
Převážná většina karcinomů prsu a ovaria se vyskytuje u žen sporadicky, bez rodinného výskytu. Absolutní riziko vývoje karcinomu prsu u žen s negativní rodinnou anamnézou se pohybuje mezi 7-10 %. Jenom malá část všech karcinomů prsu a ovaria (5-10%) je geneticky podmíněna. Většina případů hereditárních karcinomů prsu souvisí s přítomností alterací predisponujících genů s vysokou penetrancí – *BRCA1* a *BRCA2* (17q21 a 13q12-13). Zbývající malé procento hereditárních karcinomů prsu se vykytuje v souvislosti se vzácnými genetickými nádorovými syndromy jako je Li-Fraumeniho syndrom (mutace genu TP53, 17p13.1), Cowdenův syndrom (mutace PTEN genu, 10q23), Peutz-Jeghersův syndrom (mutace genu LKB1, 19p13), Muir-Torreho syndrom (varianta Lynchova syndromu s mutacemi v genech MLH1 a MSH2 patřících do tzv. „mismatch repair“ systému; 3p21, 2p15-16) a ataxie-teleangiectázie (defekt ATM genu, 11q22-23). Mutace *BRCA1* a *BRCA2* genů jsou zodpovědné za většinu hereditárních ovariálních karcinomů – asi v 70% *BRCA1*, ve 20% *BRCA2*. Zbývající případy se týkají mutací a alterací ostatních genů zodpovědných za opravu poškozené DNA (MMR – mismatch repair genes) a jsou vzácné. Hereditární nádory odlišuje od zvýšeného rodinného výskytu karcinomů nejasné etiologie především nízký věk v době stanovení diagnózy (obvykle o 15-20 let dříve ve srovnání se sporadickým karcinomem), bilaterální výskyt či duplicita, autosomálně dominantní forma dědičnosti. Příčinou predispozice k malignímu nádorovému onemocnění je přenos zárodečné mutace inaktivující jednu z alel odpovědného genu. V cílové tkáni vede pak následná genetická změna (např. ztráta druhé intaktní alely k inaktivaci genu, která iniciuje tumorogenezi, např. v důsledku genomové nestability spojené se vznikem dalších mutací. V naší studii byla metodou protein truncation testu a přímého sekvenování analyzována kódující sekvence genů *BRCA1* a *BRCA2* u 51 patientek s karcinomem ovaria v nízkém věku (early onset) nebo s karcinomem ovaria u patientek pocházejících z rodin s četným výskytem karcinomů prsu a vaječníků. Ve vyšetřované skupině bylo odhaleno 5 inaktivujících mutací genu *BRCA1*, tři inaktivující mutace genu *BRCA2* a tři sestřihové varianty genu *BRCA1*. U pozitivně testovaných patientek byli vyšetřeni i jejich příbuzní. Pozitivita je kritériem pro zařazení do systému dispenzární péče zaměřené na prevenci a časnou detekci malignit.



Pohled na Albertov - v popředí Purkyňův Ústav 1. LF



Všeobecná fakultní nemocnice



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ - POSTERY

- 1. Benešová Petra, MUDr.
- 2. Böhm Marek, MUDr.
- 3. Brabec Jiří, RNDr.
- 4. Dušková Michaela, MUDr.
- 5. Fořtová Magdalena, Ing.
- 6. Habrdová Vilma, Mgr.
- 7. Charalampidi Chanum, MUDr.
- 8. Kemling David, MUDr.
- 9. Klempíř Jiří, MUDr.
- 10. Krejčí Eliška, Ing.
- 11. Kučera Tomáš, MUDr.
- 12. Mohamed Ahmed G. , MUDr.
- 13. Šuchmová Martina, Mgr.

HODNOTITELSKÁ KOMISE:

předseda: prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
členové: prof. RNDr. František Vítek, DrSc.
doc. MUDr. Drahomíra Křenová, Csc.

DLOUHODOBÁ INTERMITENTNÍ HYPOXIE V KOMBINACI S APLIKACÍ KAINÁTU – MORFOMETRICKÁ STUDIE**Autor:** MUDr. Petra Benešová**Školitel:** prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc., Fyziologický ústav 1. LF UK, prof. MUDr. Jan Betka, DrSc. Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FNM

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

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

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

Z výsledků je patrné, že chronická hypoxie působící v perinatálním období a kainát aplikovaný normoxickým zvířatům snižují počet NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu v porovnání s kontrolní skupinou.

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

ZMĚNY AKTIVIT KOMPLEXŮ DÝCHAČÍHO ŘETĚZCE, V IZOLOVANÝCH TROMBOCYTECH U 29 ŽEN S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ**Autoři:** MUDr. Marek Böhm, MUDr. László Wenchich, MUDr. Hana Papežová, H. Hansíková a J. Zeman**Školitel:** prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Klinika dětského a dorostového lékařství a Centrum Genomiky, 1. LF UK a VFN

Úvod: Energie, potřebná pro zajištění životních funkcí eukaryotních organismů, je až z 90 % zajišťována produkcí ATP systémem oxidační fosforylace (OXPHOS) a ATP syntázou na vnitřní mitochondriální membráně. Cílem naší studie byla analýza aktivit komplexů dýchačích řetězce v trombocytech u žen s mentální anorexií, jejichž energetický přísun je ve srovnání s normální populací velmi nízký.

Materiál a metody: Soubor je tvořen 29 ženami s mentální anorexií ve věku od 18 do 35 let s BMI 15±1.5. Kontrolní soubor představuje 34 žen ve věku 20 až 35 let s BMI 25±7. Spektrofotometricky byly v izolovaných trombocytech stanoveny aktivity komplexů dýchačích řetězce I, II, III, IV a I+III a kontrolního enzymu citrát-syntázy (CS).

Výsledky: U žen s mentální anorexií nebyly ve srovnání s kontrolní skupinou nalezeny rozdíly v aktivitách komplexů dýchačích řetězce III, IV, I+III a CS, ale aktivity komplexů dýchačích řetězce I a II byly významně zvýšené: komplex I je 50.8±15.7 nmol/min/mg proteinu, kontroly 34.6±11.2, komplex II je 11.2±3.2 nmol/min/mg proteinu, kontroly 9.2±3.4, P<0.05).

Diskuze: Přestože se trombocyty podílejí jen málo na celkovém energetickém obratu organismu, představují snadno dostupný biologický materiál, který lze použít pro studium poruch energetického metabolismu. Výsledky naší studie by mohly nasvědčovat tomu, že u žen s mentální anorexií dochází ke zvýšení efektivity mitochondriálního energetického systému.

Práce vznikla s podporou projektu COST 918.40 a VZ 111100003.

ZMĚNY OBJEMŮ STRIATA V ZÁVISLOSTI NA VĚKU A JEJICH PREDIKCE ZA POUŽITÍ JEDNODUCHÉHO MĚŘENÍ**Autor:** RNDr. Jiří Brabec**Školitel:** prof. MUDr. Pavel Petrovický, DrSc., Anatomický ústav, 1. LF UK

Úvod: Volumetrie basálních ganglií je v poslední době velmi používanou metodou při stanovení klinické diagnózy a prognózy mnoha onemocnění. Předpokladem je jen dostatečné množství normálních, kontrolních hodnot. To však chybí ve většině dosud publikovaných prací. Cílem naší práce bylo (1) shromáždění velkého souboru normálních volumetrických údajů, potřebných ke (2) stanovení průměrného objemu striata, (3) s vyhodnocením jeho věkových změn a (4) nalezení jednoduchého měření, které by mohlo sloužit jako indikátor velikosti striata. Metodika: Klasickými anatomickými metodami a NMR jsme u 108 zdravých dospělých (18-89 let) stanovili objemy striata; v rozdělení na komplex: caudatum-accumbens (CD-Acc) a putamen (Put), a

statisticky je zpracovali. Výsledky: Průměrné hodnoty objemu striata jsou 7,48 cm³ (SD=0,94) pro muže a 7,42 cm³ (SD=0,95) pro ženy. Z toho na putamen v průměru připadá 51% a 50,3% ve stejném pořadí. Intersexuální ani interhemisférický rozdíl nebyl v absolutních objemech nalezen. Striatum se v závislosti na věku zmenšuje ($p < 0,0001$). Ve věkovém rozmezí 20-50 let pokles objemu činí 14,3% u mužů a 16,9% u žen. Rozdělení na dvě části ukázalo, že u mužů se komplex CD-Acc zmenší ve stejném věkovém rozmezí o 16,2%, zatímco u žen toto zmenšení nebylo prokázáno. Putamen se u mužů zmenšuje o 12,3%, u žen o 23,15%.

Plocha striata v řezu vedeném skrze commissura anterior vykazuje vysokou korelaci k jeho celkovému objemu ($p < 0,0001$, $r = 0,668$). Procentuální podíl tohoto řezu (1cm silný) je k celkovému objemu striata 28,56% (SD=3,05). Je proto velmi vhodný k orientačnímu měření.

MUŽSKÝ EKVIVALENT SYNDROMU POLYCYSTICKÝCH OVÁRIÍ

Autoři: MUDr. Michaela Dušková, Luboslav Stárka, Ivana Čermáková

Školitel: prof. MUDr. RNDr. Luboslav Stárka, DrSc., Endokrinologický ústav Praha

Syndrom polycystických ovarií (PCOS) patří mezi nejčastější endokrinní onemocnění u žen, postihuje asi 10% žen v reprodukčním věku. PCOS se vyznačuje nejen nerovnováhou v pohlavních hormonech, ale i vyšší inzulinovou resistencí. Představuje tak riziko pro rozvoj diabetu a kardiovaskulárních onemocnění. Poznatek o genetickém podkladu PCOS je založen na pozorování rodinně vázaného výskytu tohoto syndromu a hyperandrogenémie. Dosavadní nálezy předpokládají autosomálně dominantní typ dědičnosti.

Pokud má syndrom polycystických ovarií genetický základ, je evidentní, že u mužů se tyto geny vyskytují také. Je však málo literárních odkazů zabývajících se mužským fenotypem PCOS. Jako mužské symptomy tohoto syndromu byly navrženy předčasný výpad vlasů a naznačená hypertrichóza.

V naší studii jsme vyšetřovali skupinu mužů, kteří podstoupili transplantaci vlasů a byli vhodní pro léčbu finasteridem (blokátor alfa-5 reduktázy). Nemocní vykazovali analogické hormonální změny jako ženy s PCOS: nízký globulin vázající pohlavní hormony (SHBG), vyšší index volných androgenů, subnormální FSH vztažené k normální hladině LH a lehce zvýšenou koncentraci 17-hydroxyprogesteronu v plazmě. Dále jsme vyšetřovali inzulinovou rezistenci pomocí inzulinotolerančního testu.

Na základě dosavadních výsledků je možné podpořit hypotézu existence mužského ekvivalentu PCOS. Je důležité detekovat a charakterizovat tuto rizikovou subpopulaci i časně a seznámit pacienty s možným rizikem a snažit se preventivními opatřeními, tj. změnou životního stylu a pravidelnými kontrolami, snížit rozvoj eventuelních komplikací do budoucna.

Poděkování : Práce vznikla v rámci grantového úkolu IGA NB 6705-3

KLIDOVÝ ENERGETICKÝ VÝDEJ PŘI HEMODIALÝZE

Autor: Ing. Magdalena Fořtová

Školitelé: doc. MUDr. S. Sulková, DrSc., Interní oddělení Strahov 1.LF UK a VFN Praha, doc. MUDr. J. Horáček, CSc., LF UK Hradec Králové

Jen ojedinělé studie sledují klidový energetický výdej (resting energy expenditure, REE) při selhání ledvin a dosud není nic známo o průběhu hodnot REE při hemodialýze (HD). Hypoteticky lze očekávat zvýšení REE během HD (vliv zánětlivé odpovědi na mimotělní oběh), které by však mohlo být modifikováno tepelnou bilancí procedury.

REE jsme měřili metodou nepřímé kalorimetrie (Deltatrac Datex) u 13 HD pacientů (7M, 6Ž, věk 59,8±13,5 let), a to opakovaně v průběhu izotermické (ΔT=0) a termoneutrální (ΔE=0) HD. Všechny ostatní parametry sledovaných dvou HD téhož pacienta byly shodné. Kontrolní (K) soubor tvořili 4 muži a 10 žen (věk 41,3±20,5 let) bez renálního poškození.

Tepelná bilance byla výrazně odlišná: -199kJ/HD (ΔT=0) oproti -4 kJ/HD (ΔE=0). Změřené hodnoty REE u HD pacientů (7316±919 kJ/den/1,73m² před HD) byly srovnatelné s kontrolami (7264±1016 kJ/den/1,73m²), stejně jako hodnoty vypočítané. V 10.minutě HD hodnoty REE mírně a přechodně klesly (v průměru o 3,2% při termoneutrální a o 2,8% při izotermické HD, ns). V 70. minutě HD se nelišily od výchozí. Po „lehkém“ jídle ve 110.minutě byly vyšší o 8% při izotermické ($p = 0,06$) a o 6,3% při termoneutrální HD (ns), na konci HD se vrátily k predialyzačním. Vývoj hodnot REE během HD byl analogický při obou tepelných režimech.

Výsledky nepotvrdily vliv HD procedury ve sledovaných tepelných režimech na REE. Uzavíráme, že REE se u HD pacientů neliší a není významně ovlivněn hemodialýzou.

**COMPARISON OF CODEINE LEVELS IN SALIVA AND SERUM AFTER AN ORAL CODEINE ADMINISTRATION****Author:** Mgr. Vilma Habrdová**Advisor:** doc. Ing. Marie Balíková, CSc., Institute of Forensic Medicine and Toxicology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

The use of saliva or oral fluid specimens for drug analysis has been of great interest for years. Particular interest has been expressed for roadside drug testing of potentially intoxicated drivers because of advantages of saliva as a testing specimen e.g. non-invasive collection under direct observation. Similarly as other drugs, opiates may enter the oral cavity from two sources: they remain in the oral cavity after insufflation or inhalation of heroin or opium smoking, and/or opiates and their metabolites can be transferred into the oral cavity from blood. The aim of the first part of the present study was to develop and validate a toxicological method for opiate determination in serum and saliva. The second part concerns with the experimental evaluation of the relationship between saliva and serum levels after oral codeine administration to volunteers.

Three drug-free volunteers were administered a single 60-mg dose of codeine phosphate. Saliva and serum specimens were collected at various times for 9 h after administration. The samples were prepared for GC-MS (gas chromatography – mass spectrometry) analysis using solid-phase extraction on SPEC Plus DAU discs and derivatized by silylation.

The average LOD (limit of detection) value for various opiates was 3 ng/ml in saliva and 5 ng/ml in serum. The coefficients of variation at concentration levels 10 and 100 ng/ml ranged between 1.7 - 6.0% for saliva, and 1.0 - 7.0% for serum. In authentic samples of volunteers, codeine levels were 2 to 4 times higher in saliva than in serum (the mean codeine concentrations 1 h after dose were 444 ng/ml for saliva compared to 97 ng/ml for serum). However, morphine levels in saliva were comparable to those determined in serum.

The relationships between serum and saliva drug levels strongly depend on the pH-value of saliva, contamination of oral cavity, salivary flow rate, and on the intensity of plasma protein binding of the drug. Therefore, there is no direct relationship between blood and saliva concentration values.

SYNDROM NEKLIDNÝCH NOHOU – RODINNÉ A SPORADICKÉ FORMY**Autor:** MUDr. David Kemlink**Školitel:** Soňa Nevšimalová, prof., MUDr., DrSc, Neurologická klinika 1. LF UK a VFN

Syndrom neklidných nohou (RLS) je onemocnění s častým familiárním výskytem, který však v české populaci nebyl sledován stejně tak jako zastoupení primárních a sekundárních forem RLS. Odlišnosti klinického průběhu a patofyziologických souvislostí u sporadické a familiární formy stejně jako u idiopatické a sekundární formy nebyly zatím objasněny.

U pacientů trpících RLS bylo kromě klinického vyšetření provedeno stanovení hematologických a biochemických ukazatelů včetně hladin erythropoetinu a solubilního transferinového receptoru. U pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou byly sestavovány rodokmeny stran výskytu RLS. Soubor 116 pacientů trpících RLS (59,5 % žen, věkový průměr 55.4+SD=12.1 let), obsahuje 31 pacientů (61 % žen) s pozitivní rodinou anamnesou (věkový průměr 54.6 +14,3 let). U rodinných forem byl nalezen signifikantně nižší věk při nástupu obtíží ($P < 0.01$). V ostatních parametrech nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly. Ve skupině pacientů s familiární formou nebyl zjištěn významně nižší výskyt chorob podmiňujících sekundární RLS. Ve 21 rodokmenech nepříbuzných rodin bylo nalezeno celkem 60 postižených (věkový průměr 49.3+14,4 let), z nich je 60,0% žen. U 50 rodičovských párů s celkem 106 dětmi je procento výskytu RLS u dětí 40,5%. Analýza rodokmenů nasvědčuje autozomálně dominantnímu typu dědičnosti RLS s neúplnou penetrancí. V české populaci potvrdili jsme nižší věk při nástupu obtíží u rodinných forem jako jediný klinický nebo laboratorní ukazatel odlišnosti sporadických a familiárních forem RLS.

MITOCHONDRIÁLNÍ PORUCHY U HUNTINGTONOVY NEMOCI**Autoři:** MUDr. Jiří Klempíř¹, Hana Hansíková², doc. MUDr. Jan Roth, CSc.¹, Jana Židovská³ a Jiří Zeman²;
¹Neurologická klinika a ²Klinika dětského a dorostového lékařství, ³Ústav biologie a lékařské genetiky, Neurologická klinika 1. LF UK a VFN**Školitel:** doc. MUDr. Jan Roth, CSc., Neurologická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění s progredující neurologickou i psychiatrickou symptomatikou a kognitivním deficitem. HN je způsobena expanzí (CAG)_n tripletů (>40) na chromozomálním lokusu 4p16.3. Produktem patologického genu je polyglutaminová sekvence kódující protein huntingtin, jehož funkce nebyla dosud uspokojivě vysvětlena. Prevalence v HN České republiky je cca 1:20 000. U HN lze léčit pouze některé symptomy a její prognóza je fatální.

Soubor a metodika: Vyšetřili jsme 18 osob (8 mužů a 10 žen) s geneticky verifikovanou klasickou formou HN v počátečních až středně pokročilých stádiích nemoci .

V trombocytech izolovaných z periferní krve byly spektrofotometricky stanoveny aktivity citrátsyntázy (CS) a komplexů I, II, I+III, III a IV respiračního řetězce. Dále byly hodnoceny parametry: věk v době výzkumu, věk klinického počátku nemoci a trvání HN, iniciální a současné symptomy (neurologické či psychiatrické), počet (CAG)_n tripletů a heredita (maternální či paternální), medikace či komorbidita. Počet (CAG)_n tripletů byl stanoven standardní metodou z leukocytů periferní krve. Ostatní data byla získána retrospektivním způsobem.

Výsledky: Potvrdili jsme inverzní korelaci mezi počtem (CAG)_n tripletů a věkem počátku HN ($a = 0,01$). Osoby s čistě neurologickou symptomatikou se v ostatních hodnocených parametrech neliší od osob se současnou neurologickou i psychiatrickou symptomatologií ($a = 0,05$). Snížená aktivita různých mitochondriálních enzymů byla zjištěna u 7 z 18 osob (4 x cytochrom c oxidasy (COX), 3 x QH₂:cytochrom c reduktasy (QCCR), 2 x COX/CS, 2 x NADH:cytochrom c reduktasy (NCCR), 2 x sukcinát:koenzym Q reduktasy (SQR), 1 x NADH:koenzym Q reduktasy (NQR)). U 1 osoby došlo k současnému poklesu aktivity 3 enzymatických parametrů (COX/CS, NQR, SQR) a u 2 osob snížení 2 enzymatických parametrů (1x COX/CS + COX, 1 x NCCR + QCCR). Pozorovali jsme signifikantní inverzní korelaci mezi počtem (CAG)_n tripletů a aktivitou NCCR ($a = 0,05$). Našli jsme pozitivní korelaci mezi aktivitou CS a NCCR ($a = 0,05$) a rovněž mezi CS a QCCR ($a = 0,01$). Také byla nalezena pozitivní korelace mezi aktivitou NCCR a COX ($a = 0,05$).

Závěr: Mitochondriální dysfunkce u HN má pravděpodobně sekundární charakter a v periferních tkáních je velmi variabilní. Změny v energetickém metabolismu trombocytů jsou sporadické a nedosahují intenzity v ostatních tkáních a je otázkou do jaké míry odráží změny v mozku, kde je dýchací řetězec postižen nejvíce. Na vzniku mitochondriální dysfunkce se může podílet zvýšený oxidativní stres, insuficience detoxifikačních mechanismů, porucha degradace a interakce mutovaného huntingtinu. Její přesný mechanismus a význam v patologii HN je však i nadále nejasný.

Práce vznikla s částečnou podporou projektu VZ 111100003.

EXPRESI TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU C-MYB V KUŘECÍM EMBRYU A JEHO ROLE VE VÝVOJI NEURÁLNÍ LIŠTY

Autoři: Ing. Eliška Krejčí, MUDr. Pavel Šnajdr

Školitelé: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc, Anatomický ústav, 1. LF UK, RNDr. Michal Dvořák, CSc., Ústav molekulární genetiky, AV ČR

Transkripční faktor c-Myb je zatím znám jako jeden z klíčových regulačních prvků definitivní krvetvorby. Účastní se udržování populace nezralých myeloidních a erythroidních buněk. V průběhu jejich terminální diferenciace exprese *c-myb* klesá až vymizí. Podle nepočetných literárních údajů je *c-myb* exprimován i v několika nekrvotvorných tkáních. O jeho případné úloze v časných fázích embryonálního vývoje dosud není nic známo.

Ve svých experimentech jsme se soustředili právě na tato časná stadia vývoje kuřecího zárodku (stadium 2 – 18 podle Hamburgera a Hamiltona). Expresi genu *c-myb* jsme detegovali pomocí technik Western a Northern blot, hybridisací *in situ* a imunohistochemicky. Dále jsme pomocí inhibice exprese endogenního *c-myb* (antisense oligonukleotidy) a nadexprese exogenního *c-myb*, studovali na tkáňových explantátech neurální trubice a neurální ploténky roli tohoto transkripčního faktoru ve vývoji neurální lišty.

Zjistili jsme, že v kuřecím embryu je *c-myb* exprimován již velmi brzy, ve stadiu tvořícího se primitivního proužku. Jeho přítomnost není omezena pouze na určité primordiální struktury, ale detegujeme ji ve většině buněk. Výjimku tvoří pravděpodobně již diferenciované krevní buňky v primitivních cévách (krevní ostrůvky *c-myb* exprimují) a také individuální buňky uvnitř celého embrya, které mohou představovat různé buněčné typy. Předpokládáme, že všechny buňky, které neexprimují *c-myb*, již ztratily proliferativní potenciál.

Aplikace antisense oligonukleotidů na tkáňové explantáty neurální trubice vede k redukci počtu migrujících buněk neurální lišty. Tato redukce může být kompenzována expresí exogenního *c-myb*. Navíc antisense oligonukleotidy blokují indukcii buněk neurální lišty v neurální ploténce, navozenou BMP4.

Z našich výsledků vyplývá, že v časných fázích vývoje kuřecího embrya je *c-myb* exprimován téměř ve všech proliferujících buňkách. Při vývoji neurální lišty je c-Myb zřejmě nezbytný pro její indukcii a pro epithelo-mesenchymovou transformaci

Podpořeno granty: VZ 111100003-3 a GAČR 304/03/0463

IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE ENOS A INOS U ADENOMU A HYPERPLASIE PŘÍŠTÍTNÉHO TĚLÍSKA**Autoři:** MUDr. Tomáš Kučera, David Veselý, Jaromír Astl a Jindřich Martínek**Školitel:** prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc., Ústav pro histologii a embryologii 1.LF UK

Úvod: NO-syntázy (NOS) jsou enzymy katalyzující tvorbu oxidu dusnatého. Jsou známy tři izoformy: endotelová (eNOS) a neuronální (nNOS), které konstitutivně produkují relativně malá kvanta NO, a inducibilní (iNOS), jež je exprimována v reakci na nejrůznější podněty a katalyzuje tvorbu velkého množství NO. Byla popsána řada onemocnění, kde snížená či zvýšená produkce NO představuje významný etiopatologický faktor. V rámci studia vlivu NO na proliferaci a buněčnou smrt jsme se v této studii zaměřili na onemocnění příštítných tělísek spojená se zmnožením buněk - adenom (PTA) a sekundární hyperplasie paratyroidey (HPT). Literární data týkající se exprese NOS v tkáni příštítného tělíska jsou omezená, a proto naším prvotním cílem bylo detekovat eNOS a iNOS v normálním, adenomatózním a hyperplastickém příštítném tělísku.

Metody: Vzorky tkáně PTA a HPT byly odebrány během operace a zpracovány pro imunohistochemický průkaz ve zmrazených řezech. Řezy byly inkubovány s králíčími polyklonálními protilátkami anti-iNOS a anti-eNOS (Santa Cruz). Biotinylovaná sekundární protilátka goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz) byla detekována pomocí Vectastain ABC-AP kit (Vector). Pro vizualizaci byl použit alfa-naftylfosfát a Fast Red TR (Sigma) jako reagensie pro průkaz alkalické fosfatázy.

Výsledky: Pozitivita imunohistochemické reakce pro eNOS byla zjištěna ve všech vzorcích PTA, HPT i v normálním příštítném tělísku, přilehlém ke vzorku s PTA. eNOS byla pravidelně detekována v endotelu cév vaziva a v části kapilárního řečiště parenchymu. Nejvýraznější reakce byla zastižena u cév příslušejících k arteriálnímu řečišti. Úroveň exprese eNOS v endotelu kapilár se lišila mezi jednotlivými vzorky, ale nebyla charakteristická pro určitou poruchu. Celková exprese eNOS byla určena především zastoupením větších cév v tkáni. Přítomnost iNOS nebyla potvrzena v žádném z vyšetřovaných vzorků.

Závěr: Ve vyšetřených vzorcích jsme prokázali expresi eNOS, která v tkáni zajišťuje především potřebnou úroveň krevního zásobení. Jelikož nebyly nalezeny zřetelné rozdíly mezi vzorky, nebude pravděpodobně tento isoenzym výrazněji přispívat k porušené homeostáze příštítného tělíska. S ohledem na negativní nálezy produkce iNOS, je možné se domnívat, že NO nehraje rozhodující roli v patogenezi PTA a PGH.

Tato práce byla podporována z grantu GAUK 5/2002/C a výzkumného záměru J 13/98 111100002-6.

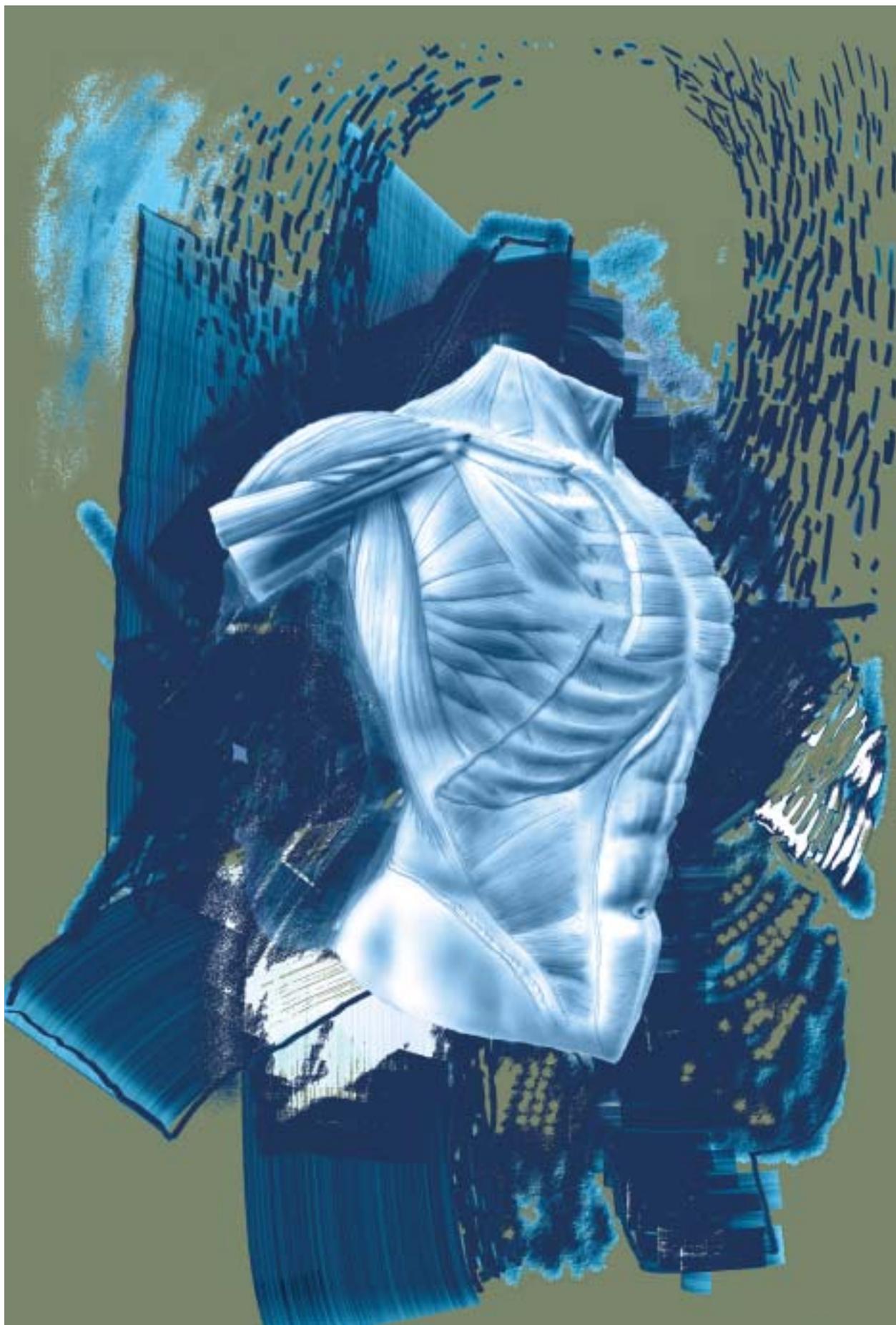
THORAKÁLNÍ ELEKTRICKÁ BIOIMPEDANCE A JEJÍ MOŽNOST VYUŽITÍ PŘI MAXIMÁLNÍ ZÁTĚŽI**Autoři:** MUDr. Ghana Mohamed Ahmed^{1,2}, MUDr. Chanum Charalampidi², Mgr. Martina Šuchmová¹**Školitelé:** doc. MUDr. Zdenek Vilikus, CSc., Ústav tělovýchovného lékařství 1. LF UK a VFN, doc. MUDr. Aleš Linhart, CSc., II. interní klinika - klinika kardiologie a angiologie, 1. LF UK a VFN

ÚVOD: Thorakální elektrická bioimpedance (TEB) je jednou z mála neinvazivních vyšetřovacích metod centrální hemodynamiky, která je použitelná i při fyzické zátěži. Podle metaanalýzy Milese a Gotshalla (1989) byla TEB použita jen při submaximální dynamické zátěži. CÍL: Cílem naší práce bylo vyzkoušet použitelnost TEB při zátěži do víta maxima a pomocí TEB zhodnotit hemodynamiku u osob s různou fyzickou aerobní zdatností na úrovni víta maxima. METODIKA: Vyšetřili jsme 70 cyklistů resp. 70 nespportovců srovnatelného věku (3. decennium) s velmi odlišnou fyzickou zdatností. Současně s klasickou spiroergometrií byly měřeny hemodynamické ukazatele pomocí TEB na komerčně vyrobeném přístroji HOTMAN™ B100. Ukazatele zdatnosti a hemodynamiky jsme

porovnali mezi skupinami nepárovým Studentovým t-testem. VÝSLEDKY-. Technicky hodnotitelných záznamů TEB bylo u sk. C 44 (62,3%), u sk. K 47 (67,1%). Cyklisté měli vyšší fyzickou zdatnost ve všech měřených spiroergometrických parametrech ($p < 0,001$). Maximální srdeční index u sk. C byl $15,7 \pm 3,8 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^2$ resp. u sk. K $12,9 \pm 3,3 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^2$ ($p < 0,001$); index kontraktility (ISI_{max}) byl $2,95 \pm 0,70 \text{ sec}^{-2}$ resp. $2,21 \pm 0,54 \text{ sec}^{-2}$ ($p < 0,001$) a index systémové vaskulární rezistence ($SSVRI_{\text{max}}$) $96 \pm 32 \text{ [dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^5 \cdot \text{m}^2]$ resp. $132 \pm 45 \text{ [dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^5 \cdot \text{m}^2]$ ($p < 0,001$). ZÁVĚRY: Hodnotitelnost záznamů TEB při maximální zátěži na bicyklovém ergometru se pohybovala kolem **65%**. U zdatnějších osob byly při maximální zátěži pomocí TEB naměřeny vyšší přečerpávací funkce srdce, vyšší kontraktilita a nižší systémová vaskulární rezistence, což je v souladu s poznatky z oblasti zátěžové fyziologie. TEB je použitelná i při maximální zátěži, avšak pro její rutinní uplatnění bude nutné technicky (nejspíše s využitím biokybernetických postupů) odfiltrovat artefakty způsobené respirací a pohybem pacienta.

HODNOCENÍ SOMATOTYPU PODLE CARTERA A HEATHOVÉ V TABULKOVÉM PROCESORU EXCEL**Autoři:** Mgr. Martina Šuchmová, MUDr. Ghada Mohamed Ahmed**Školitel:** doc. MUDr. Zdeněk Vilikus, CSc., Ústav tělovýchovného lékařství 1. LF UK a VFN

ÚVOD: Jednotlivé morfologické znaky mající vztah ke tvaru a složení těla mohou být vyjádřeny číselnými hodnotami. Podle somatotypu je možno posoudit, jaké má jedinec pohybové dispozice: 1. silové, 2. nesilové (rychlostní, obratnostní a vytrvalostní). Stanovení somatotypu je však dosti pracné a tedy relativně i časově náročné. CÍL: Cílem naší práce bylo vytvořit softwarovou (dále jen SW) aplikaci pro interaktivní stanovení somatotypu z 11 naměřených antropometrických dat v prostředí MS Excel. METODIKA: Počítačové stanovení somatotypu využívá téhož výpočtového formuláře jako autoři Carter a Heathová, avšak v modifikaci uzpůsobené pro excelovskou aplikaci. Ke stanovení jednotlivých komponent somatotypu jsme zvolili interní funkci VERTIKÁLNÍ VYHLEDÁVÁNÍ. Ke stanovení pohybových vlastností daných somatotypem podle Chytráčkové (1989) jsme zvolili interní funkci HORIZONTÁLNÍ VYHLEDÁVÁNÍ, která podle zjištěného trojčíslí somatotypu vybere z pěti tříd (A až E) odpovídající pohybové dispozice. VÝSLEDKY: Po zadání vstupních dat 11 antropometrických parametrů SW aplikace ihned vrátí: 1. číselnou hodnotu somatotypu a 2. polohu somatotypu ve formě červeného bodu interaktivně umístěného v somatografu, 3. slovní interpretaci somatotypu a 4. slovní hodnocení pohybových dispozic. ZÁVĚR: Počítačové vyhodnocení somatotypu snižuje riziko chyb na minimum, je plně reprodukovatelné, je velmi rychlé a interaktivní. SW aplikace by se mohla stát užitečnou pomůckou především pro tělovýchovné lékaře, ale i pro lékaře jiných specializací (diabetologie, preventivní kardiologie, obezitologie), kteří potřebují znát morfologické dispozice k pohybové aktivitě pacienta.



SEKCE PREGRADUÁLNÍ - TEORETICKÁ ČÁST

UMÍSTĚNÍ

1. MÍSTO

Říha Pavel, 3.r.

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Křemen, DrSc.

Název práce:

„The transfer of mutant Cd36 gene from SHR/Ola, spontaneously hypertensive rat, onto genetic background of PD/Cub strain, model of metabolic syndrome X.“

2. MÍSTO

Šedý Jiří, 5.r.

Školitel: prof. MUDr. Jan Kučera, PhD., prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

Název práce:

„Nadměrná exprese neurotrofinu-3 ve svalech myši s vyřazeným genem *Er81* zachrání axonální projekce proprioceptivních neuronů k motoneuronům.“

3. MÍSTO

Pelichovská Tereza, 6.r.

Školitel: RNDr. Luděk Šefc, CSc.

Název práce:

„Effect of Total Body Irradiation Dose Together with Proper Timing Between Cyclophosphamide and Irradiation on Engraftment of Donor Cells in Experimental urine Model of Bone Marrow Transplantation.“

1. místo

THE TRANSFER OF MUTANT CD36 GENE FROM SHR/OLA, SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT, ONTO GENETIC BACKGROUND OF PD/CUB STRAIN, MODEL OF METABOLIC SYNDROME X (Cd36/congenic strain/genetic model/metabolic syndrome X/PD/PD. SHR-Cd36/SHR)

Author: Pavel Říha

Advisor: prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc.

Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague



Pavel Říha

Abbreviations: BN – Brown Norway rat, Cd36 – cluster of differentiation 36 (gene), CD36 – cluster of differentiation 36 (protein), Cub – Charles University Biology, FAT – fatty acid translocase, IL6 – interleukin 6 (gene), LDL – low density lipoproteins, Ola – Harlan Olac Ltd. PBS – phosphate buffered saline, PCR – polymerase chain reaction, PD – polydactylous rat, RNO – rat chromosome, Rt – rat blood group, SHR – spontaneously hypertensive rat, TSP – thrombospondin.

Corresponding author: Pavel Říha, c/o prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc., Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Albertov 4, 128 00 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 606 457 420; e-mail: p.riha@seznam.cz

INTRODUCTION

Metabolic syndrome X

Insulin resistance often clusters with other risk factors of the cardiovascular diseases as disorders in saccharide and lipid metabolism, dyslipidemia, obesity and essential hypertension (Reaven, 1988). The combination of these symptoms is called the metabolic syndrome X. The symptoms are one of the most severe recent health threats and nearly 25 % of population in the western countries suffer from some of them.

Association of symptoms of metabolic syndrome X is a very complex disorder determined by multiple genes, as well as gene–gene and gene–environment interactions. Cd36/FAT was identified as one of the genes involved in the insulin resistance and dyslipidemia in rats (Aitman et al., 1999; Pravenec et al., 2000).

Cd36/FAT

CD36 receptor has been independently discovered, described and named as fatty acid translocase, platelet TSP receptor, platelet glycoprotein GPIIb or GPIV, platelet collagen receptor or Nak³-antigen. Nowadays it is classified as a member of scavenger receptor superfamily.

CD36 recognises long-chain fatty acids, oxidised LDLs, anionic phospholipids, TSP, collagen, shed outer segments of rods, sickle erythrocytes and *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Therefore CD36 participates in many physiological processes as lipid metabolism, adipocytes' development and maturation, senescent and apoptotic cells recognition, blood clotting, cell adhesion, angiogenesis and vision. Also it is involved in pathological processes as foam cells formation, sickle cell anaemia and tropical malaria. (Febbraio et al., 2001)

Cd36 gene has been mapped at centromeric region of rat chromosome 4. CD36 receptor is present on plasmalemma of adipocytes, monocytes, macrophages, platelets, erythrocytes, microvascular endothelial cells, pigment epithelia of retina, heart and striated muscle cells. CD36 expressed on rats erythrocytes has been proved identical with Rt8 blood group antigen (Kren et al., 2001).

The presence of mutant Cd36 allele in SHR rat strain is associated with insulin resistance and dyslipidemia. These disorders can be improved by introgression of wild type Cd36 allele by congenic strain production or by transgenic rescue (Aitman et al., 1999; Pravenec et al., 2001).

In order to better understand the role of Cd36 in metabolic disorders, a new rat congenic strain PD.SHR-Cd36 is being developed by transferring the mutant Cd36 gene from spontaneously hypertensive rat onto the genetic background of PD/Cub strain as the model of metabolic syndrome X.

MATERIALS AND METHODS

Rat strains

The spontaneously hypertensive rat (**SHR/Ola**) is widely recognized animal model for study of clustering risk factors for cardiovascular diseases. The increased blood pressure is accompanied by defective insulin action on glucose metabolism, reduced catecholamine action on lipolysis in adipocytes and dyslipidemia (Reaven et al., 1991). Disorders in fatty acid and glucose metabolism were linked to the spontaneous deletion mutation (Cd36⁻) in Cd36 gene (Aitman et al., 1999).

The highly inbred polydactylous rat strain (**PD/Cub**) has been established as a model of polydactyly-luxate syndrome (Kren, 1975), limb development and teratology (Kren et al., 1996), hypertriglyceridemia and metabolic syndrome X (Sedova et al., 2000).

Highly inbred Brown Norway rat strain (**BN/Cub**) expresses the wild type of Cd36 gene (Cd36+).

The BN.SHR-II6/Cd36 congenic rat strain (**BN.SHR-4**) was derived by introgressing the RNO4 segment carrying mutant Cd36 gene of the SHR origin onto the genetic background of BN/Cub strain (Seda et al., 2002).

Genotyping

DNA of bred animals was obtained from tail biopsies. Tissues were incubated for 24 hours at 55° C in the digest buffer with proteinase K (Sigma) to dissolve.

DNA was isolated by phenol-chloroform-isoamylalcohol extraction and precipitated by ethanol. The DNA pellet was dissolved in the Tris-EDTA buffer.

Polymerase chain reaction was used to detect polymorphisms in intron 13 and exon 14 of Cd36 gene and flanking markers D4Rat7, II6 and D4Bro1. Primers used for the PCR detection of microsatellite markers in genes or anonymous DNA sequences were synthesized commercially according to published sequences.

After the electrophoresis on 10% or 5% acrylamide gel the PCR products were visualised with ethidium bromide and detected by Insta DocTM Gel Documentation System Biorad and analysed by Multianalyst Biorad software.

Hemagglutination

The alloantiserum BN.SHR-4 anti BN was prepared by immunization of BN.SHR-4 rats (Cd36-, ie. Rt8-) by full blood of BN/Cub rats (Cd36+, ie. Rt8+).

The blood was drawn from the immunized BN.SHR-4 rats by intracardial injection. The taken blood was substituted by intraperitoneal injection of 5 ml of PBS. The serum was separated by centrifugation. Red blood cell suspension was obtained from heparinized blood after centrifugation and PBS dilution.

The hemagglutination test was performed on microarrays, where 20 ěl of erythrocyte suspension was mixed with 60 ěl of alloantiserum BN.SHR-4 anti BN (diluted in PBS to 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 or 1/160 of its original concentration). The results of the hemagglutination test were assessed one hour after the alloantiserum addition and recorded by digital camera.

Metabolic measurement

The male rats aged 4 months (6 per group) of PD/Cub and PD.SHR-Cd36 strain (the equivalent of the fourth backcross generation) were used in the experiment. The rats had free access to water and they were fed standard chow. The blood for metabolic measurements was obtained from tail veins under light anesthesia.

The serum concentration of triglycerides was determined in not fasted animals by commercially available analytical kit (Lachema, Brno, Czech Republic).

RESULTS

Breeding

The cross-intercross (Figure 4) and backcross mating was used for PCR guided development of the new congenic strain PD.SHR-Cd36. Until these days the equivalent of six backcross generations has been reached (ca. 98% of PD genetic background obtained).

Genotyping

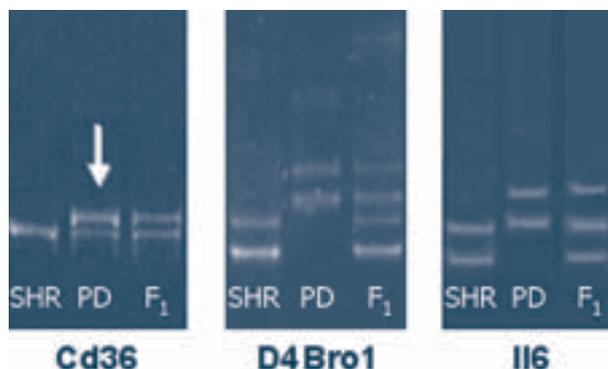


Figure 1: PCR products stained by ethidium bromide. Fragments were amplified by PCR using primers for Cd36, D4Bro1 and II6. SHR corresponds to homozygous Cd36-/Cd36-, PD to homozygous Cd36+/Cd36+ and the first filial generation (F₁) to heterozygous Cd36+/Cd36-. The arrow indicates the fragment length polymorphism in Cd36 of PD rats undistinguishable from F₁ heterozygous Cd36+/Cd36-.

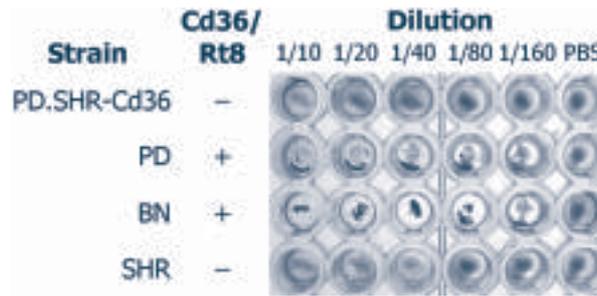


Figure 2: Results of the hemagglutination. Alloantiserum BN.SHR-4 anti BN agglutinated rat erythrocytes expressing the wild type CD36/Rt8 (ie. strains PD and BN). Erythrocytes of strains SHR and PD.SHR-Cd36 carrying the mutant CD36/Rt8 did not agglutinate. The last column of wells displays negative control, where PBS was added instead of the alloantiserum.

The genotyping of bred rats served to guide the development of the new rat congenic strain PD.SHR-

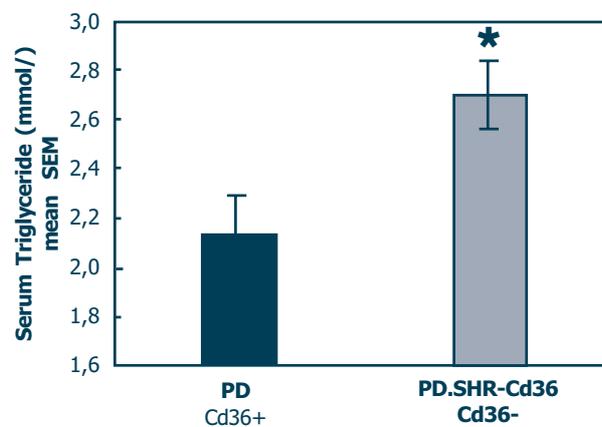


Figure 3: Serum triglyceride levels (mmol/l) in not fasted animals after standard diet. Values are given as mean \pm SEM. Significant difference is shown as * ... $P = 0.019$ (unpaired two-tailed t-test).

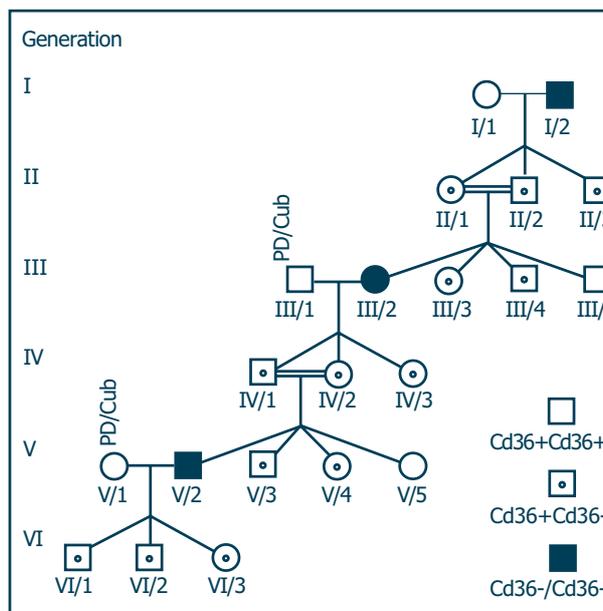


Figure 4: Pedigree chart of the development of PD.SHR-Cd36 congenic strain by the cross-intercross mating. Circles represent female rats, squares male rats. Open symbols denote Cd36+/Cd36+ homozygous individuals, dotted symbols Cd36+/Cd36- heterozygous individuals and filled symbols Cd36-/Cd36- homozygous individuals. Double marriage lines represent mating among siblings.

Cd36. Altogether 4 microsatellite markers were tested on the desired part of the rat chromosome 4.

The PCR pattern of Cd36 gene in PD strain does not allow distinguishing heterozygous Cd36+/Cd36- from homozygous Cd36+/Cd36+ rats (Figure 1). Hence it was needed to use cross-intercross mating (Figure 4) instead of quicker backcross mating in the derivation of the congenic strain, before distinct markers were found.

It was ascertained that the Cd36 region flanking markers D4Rat7, D4Bro1 and Il6 exhibit polymorphism between SHR and PD strains pronounced as explicitly different lengths of PCR products (Figure 1). Since they are close enough to Cd36 gene (distant 2, 8 and 12 cM respectively), it is possible to use them to distinguish the heterozygous Cd36+/Cd36- rats.

Hemagglutination

The hemagglutination enabled to ascertain the presence of the wild type CD36 on rats' erythrocytes.

The alloantiserum BN.SHR-4 (Cd36-) anti BN distinguished the rat erythrocytes carrying at least one wild type CD36 receptor. Consequently, the erythrocytes of homozygous Cd36+/Cd36+ and heterozygous Cd36+/Cd36- rats were agglutinated while erythrocytes of homozygous Cd36-/Cd36- rats exhibit negative reaction (Figure 2).

Serum triglyceride levels

PD.SHR-Cd36 rats from the equivalent of the fourth backcross generation had significantly ($P = 0.019$; unpaired two-tailed *t*-test) higher mean serum triglyceride level than PD/Cub rats (Figure 3).

The introgression of the mutant Cd36 gene onto PD/Cub genetic background increased the mean serum triglyceride level in PD.SHR-Cd36 in comparison with PD/Cub stain. This result supports the important contribution of Cd36 gene to triglyceride metabolism.

DISCUSSION

The genetically defined animal model of a disease provides a deeper insight into roles of genes involved in the particular pathological process. All traits of the metabolic syndrome X are not always expressed together in one model rat strain. Thus, PD/Cub strain exhibits higher hypertriglyceridemia and insulin resistance than SHR/Ola. On the other hand, SHR/Ola exhibits much stronger hypertension than PD/Cub. The development of a new rat congenic strain PD.SHR-Cd36 would make possible to analyse the impact of the mutant Cd36 gene in the interaction with the genetic background of PD/Cub strain as a model of metabolic syndrome X (Sedova et al., 2000).

Cd36 gene was shown to be involved in the free fatty acids metabolism and the insulin resistance. One of the reasons is that Cd36 expression is being directly induced by nuclear receptor PPAR α . PPAR α is involved in adipogenesis, insulin action and in positive feedback loop in foam cells formation. Thus the glucose-mediated up-regulation of Cd36 expression is considered as a possible link between diabetes and angiopathy. Defective CD36 function was shown to increase serum triglycerides level and decrease LDLs clearance. These metabolic disturbances are serious risk factors of cardiovascular diseases and animal models make it possible to analyze the mechanisms of pharmacological intervention.

So far assessed metabolic characteristics of PD.SHR-Cd36 strain are consistent with the assumed role of Cd36 in triglyceride metabolism. The results are in consent with the study indicating that Cd36-null mice have extensively increased serum triglyceride levels (Li et al., 2000). The studies of our laboratories (Kren et al., 2000; Pravenec et al., 2001) implied that the replacement of defective Cd36 by wild type Cd36 from BN/Cub strain by congenic strain production or transgenesis significantly lowered serum triglyceride levels.

Cd36 was proven to be involved in the action of thiazolidinediones that are used in the therapy of insulin resistance (Qi et al., 2002; Seda et al., 2003). When the PD.SHR-Cd36 congenic strain is completed (reached at least the equivalent of the eight backcross generation) and its metabolic characteristics established it would be exploited for antidiabetic drug testing.

Last but not least, Cd36 mutations are known in humans. Approximately 2 – 3 % of population in South-East Asia and Sub-Saharan Africa and up to 0.3 % of the European population suffer from the CD36 deficiency (called Nak³-negative phenotype). It was proved that among such afflicted people is higher prevalence of insulin resistance, hypertriglyceridemia, hypertension, coronary heart disease and hereditary hypertrophic cardiomyopathy.

The mutant or wild type Cd36 introgression onto various defined genetic backgrounds is an efficient method to gain new model strains to assess the CD36 role in pathogenesis of symptoms of metabolic syndrome X.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author is deeply indebted to prof. MUDr. Vladimír Křen, DrSc. and doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc. for their kind support and valuable advices and last but not least Ms. Michaela Janků, Zdeňka Kopecká and Marie Uxová for their excellent technical assistance. A special acknowledgement belongs to Ing. L. Kazdová, CSc.



from the Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic for performing the metabolic measurements.

This study was supported by grants GA ČR 303/01/1010 and 204/98/K015.

REFERENCES

1. Aitman, T.J., Glazier, A.M., Wallace, C.A. et al. Identification of *Cd36* (*Fat*) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* **21**, 76-83 (1999).
2. Febbraio, M., Hajjar, D.P. & Silverstein, R.L. *CD36*: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* **108**, 785-91 (2001).
3. Kren, V. Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol Med Monogr*, 1-103 (1975).
4. Kren, V., Bila, V., Kaspárek, R. et al. Recombinant inbred and congenic strains of the rat for genetic analysis of limb morphogenesis. *Folia Biol (Praha)* **42**, 159-66 (1996).
5. Kren, V., Simakova, M., Musilova, A. et al. SHR.BN-congenic strains for genetic analysis of multifactorially determined traits. *Folia Biol (Praha)* **46**, 25-9 (2000).
6. Kren, V., Krenova, D., Liska, F. et al. The relationship between *Cd36*/*Fat* and *Rt8* red blood cell [RBC] alloantigen in the rat. *J Mol Med* **79**, B1-B34 (2001).
7. Li, A.C., Brown, K.K., Silvestre, M.J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* **106**, 523-31 (2000).
8. Pravenec, M., Zidek, V., Landa, V. et al. Genetic analysis of cardiovascular risk factor clustering in spontaneous hypertension. *Folia Biol (Praha)* **46**, 233-40 (2000).
9. Pravenec, M., Landa, V., Zidek, V. et al. Transgenic rescue of defective *Cd36* ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* **27**, 156-8 (2001).
10. Qi, N., Kazdova, L., Zidek, V. et al. Pharmacogenetic evidence that *cd36* is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *J Biol Chem* **277**, 48501-7 (2002).
11. Reaven, G.M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595-607 (1988).
12. Reaven, G.M. & Chang, H. Relationship between blood pressure, plasma insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens* **4**, 34-8 (1991).
13. Seda, O., Sedova, L., Kazdova, L. et al. Metabolic characterization of insulin resistance syndrome feature loci in three brown Norway-derived congenic strains. *Folia Biol (Praha)* **48**, 81-8 (2002).
14. Seda, O., Kazdova, L., Krenova, D. et al. Rosiglitazone fails to improve hypertriglyceridemia and glucose tolerance in *CD36*-deficient BN.SHR4 congenic rat strain. *Physiol Genomics* **12**, 73-8 (2003).
15. Sedova, L., Kazdova, L., Seda, O. et al. Rat inbred PD/Cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. *Folia Biol (Praha)* **46**, 99-106 (2000).

2. místo

NADMĚRNÁ EXPRESE NEUROTOFINU-3 VE SVALECH MYŠI S VYRAZENÝM GENEM *ER81* ZACHRÁNÍ AXONÁLNÍ PROJEKCE PROPRIOCEPTIVNÍCH NEURONŮ K MOTONEURONŮM

Autor : Jiří Šedý

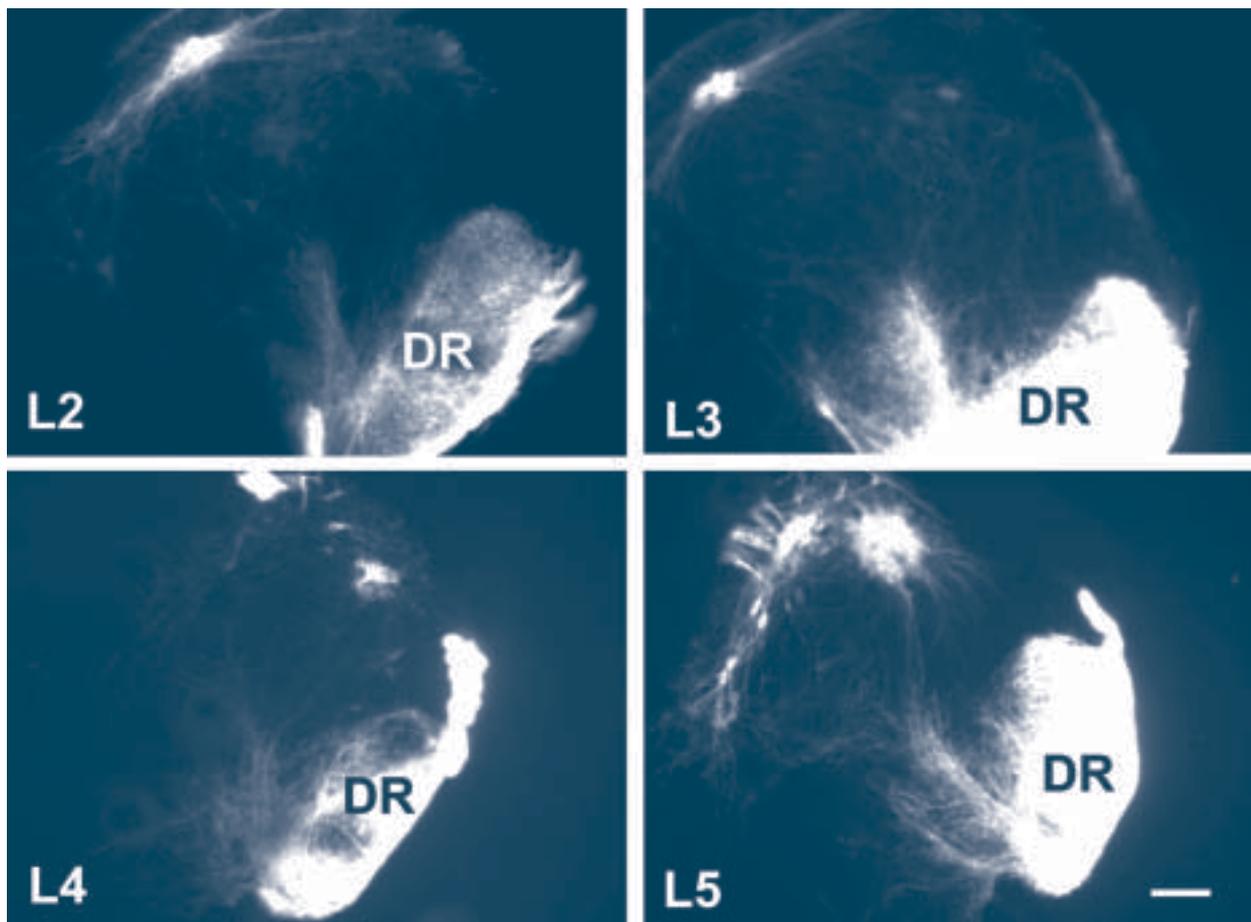
Školitelé : prof. Jan Kučera, MD, PhD., Department of Neurology, Boston University, USA; prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc., Anatomický ústav 1. LF UK



Jiří Šedý

Úvod. ER81, člen ETS rodiny transkripčních faktorů, je klíčový faktor regulace projekcí propioceptivních Ia neuronů k míšním motoneuronům (Arber *et al.*, 2000). *Er81(-/-)* mutantní myši mají výrazné poruchy motoriky, rezultující z chybění těchto projekcí a s tím spojené redukce počtu svalových vřetének ve svalecth. Neurotrophin-3 (NT-3) je růstový faktor patřící k neurotrofinům, který mimo jiné facilituje funkci Ia aferentních neuronů a utváření svalových vřetének (Chen *et al.*, 2002). Chybění NT-3 ve svalu má za následek vymizení svalových vřetének (Ernfors *et al.*, 1994). U dvojité mutantní myši *Er81(-/-);myo-NT-3*, která ve svalu exprimuje zvýšené množství NT-3 se svalová vřeténka tvoří a pohybová aktivita je zachována. Naším cílem bylo zjistit, zda v tomto případě budou projekce Ia aferentních vláken k motoneuronům zachovány.

Materiál a metody. Do spinálních ganglií myši (*Er81(-/-);myo-NT-3*, *Er81(-/-)*, *myo-NT-3*, wild type) fixovaných perfuzí 4% PFA bylo aplikováno lipofilní barvivo DiI. Pak byly tkáně 7 dní inkubovány při 40°C ve 4% PFA. Vypreparovaný úsek míchy byl zalit do 3,5% agaru, krájen na vibratomu a řezy byly studovány ve fluorescenčním mikroskopu s rhodaminovým filtrem a fotografovány.



OBR. 1. GRADIENT PROJEKČÍ SENSITIVNÍCH NEURONŮ K MOTONEURONŮM U *ER81(-/-)* MYŠÍ. TRANSVERSÁLNÍ ŘEZY MÍCHOU NA ÚROVNÍCH L2 – L5. DR – DORSÁLNÍ ROH. MĚŘÍTKO – 100 UM.



Výsledky. U *Er81(-/-)* mutantních myší jsme v segmentech L_2 - L_5 pozorovali podobně jako Arber *et al.* (2000) výraznou redukci projekcí proprioceptivních Ia neuronů k motoneuronům. Navíc se ukázalo, že redukce vykazuje určitý gradient. V segmentu L_5 byl úbytek vyjádřen nejméně, v úrovni L_2 nejvíce. U *Er81(-/-);myoNT-3* dvojitého mutant byla hustota projekcí srovnatelná s kontrolou. U samotné *myo-NT-3* mutanty jsme výrazněji zvýšenou denzitu projekcí nezjistili.

Závěr. Nadměrná exprese NT-3 ve svalu zabrání ztrátě projekcí sensitivních Ia neuronů k motoneuronům podmíněné absencí *Er81*. Molekulární mechanismus této kompenzace není zatím jasný. Předpokládáme, že nadexprese NT-3 ve svalu aktivuje v Ia neuronech některý z dalších genů ETS rodiny, který zastoupí chybějící *ER81*. Tuto možnost naznačuje zjištění, že již samotná exprese *Er81* je podmíněna působením NT-3 (Patel *et al.*, 2003).

Úvod

ER81 patří do ETS rodiny transkripčních faktorů. Její členové (např. *PEA3*, *Erm*, *Elk 1*) se podílejí na utváření mezineuronových míšních projekcí (Ghosh *et al.*, 1998).

ER81 je klíčový faktor regulace projekcí proprioceptivních Ia neuronů k motoneuronům v předních rozích míšních (Arber *et al.*, 2000). Je exprimován mimo jiné v neuronech spinálních ganglií, motoneuronech a intrafusálních vlákních (Lin *et al.*, 1998; Arber *et al.*, 2000). *Er81(-/-)* mutantní myši mají výrazné poruchy motoriky, rezultující z chybějících projekcí Ia neuronů k motoneuronům a s tím spojené redukce počtu svalových vřetének ve svalech.

Neurotrophin-3 (NT-3) je růstový faktor z rodiny neurotrofinů, který se uplatňuje v proliferaci, diferenciaci, přežívání a funkceschopnosti aferentních neuronů a utváření svalových vřetének (Chen *et al.*, 1999). Chybění NT-3 v končetinových svalech u myši má za následek úplné vymizení svalových vřetének (Ernfors *et al.*, 1994) a z toho rezultující výrazné defekty motoriky. Je prokázáno, že za toto vymizení je selektivně odpovědný NT-3 v kosterním svalu (Chen *et al.*, 2003).

U dvojité mutantní myši *Er81(-/-);myo-NT-3*, která ve svalu exprimuje zvýšené množství NT-3 se svalová vřeténka tvoří a pohybová aktivita je zachována.

Naším cílem bylo zjistit, zda u dvojité transgenních myši *Er81(-/-);myo-NT-3* zachrání nadexprese NT-3 ve svalu projekce proprioceptivních neuronů k motoneuronům. Rovněž nás zajímalo, zda je porucha utváření těchto projekcí u *Er81(-/-)* myši vyjádřena stejnou měrou v jednotlivých segmentech L_2 - L_5 .

Materiál a metodika

V této studii byly použity 2 kmeny mutantních myší. Kmen myši s vyřazeným genem *Er81* (Arber *et al.*, 2000) a kmen, u kterého bylo za myogenní promotor vloženo zvýšené množství kopií genu pro neurotrophin-3 (*myo-NT-3*), která umožňuje selektivní nadexpresi NT-3 v kosterním svalu (Wright *et al.*, 1997). Zkřížením těchto kmenů jsme získali dvojité transgenní myš *Er81(-/-);myo-NT-3*.

Genotypizaci prováděl v laboratoři prof. Kučery E. Pound pomocí PCR s použitím příslušných primerů. Myši (*Er81(-/-)*, *myo-NT-3*, *Er81(-/-);myo-NT-3* a kontroly) byly v pentobarbitalové anestezii podrobeny perfuzi 4% PFA přes levou srdeční komoru. Poté bylo vypreparováno příslušné spinální ganglion, do kterého bylo aplikováno lipofilní barvivo DiI (1,1'-dioctadecyl - 3, 3', 3', 3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Sigma), rozpuštěné v dimethylsulfoxidu. Tkáně byly ponořeny zpět do 4% PFA a inkubovány 5-7 dní při teplotě 40°C. Poté byl vypreparován daný úsek míchy, zalit do 3,5 % agaru a krájen na vibratomu. Řezy byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu a dokumentovány.

Výsledky

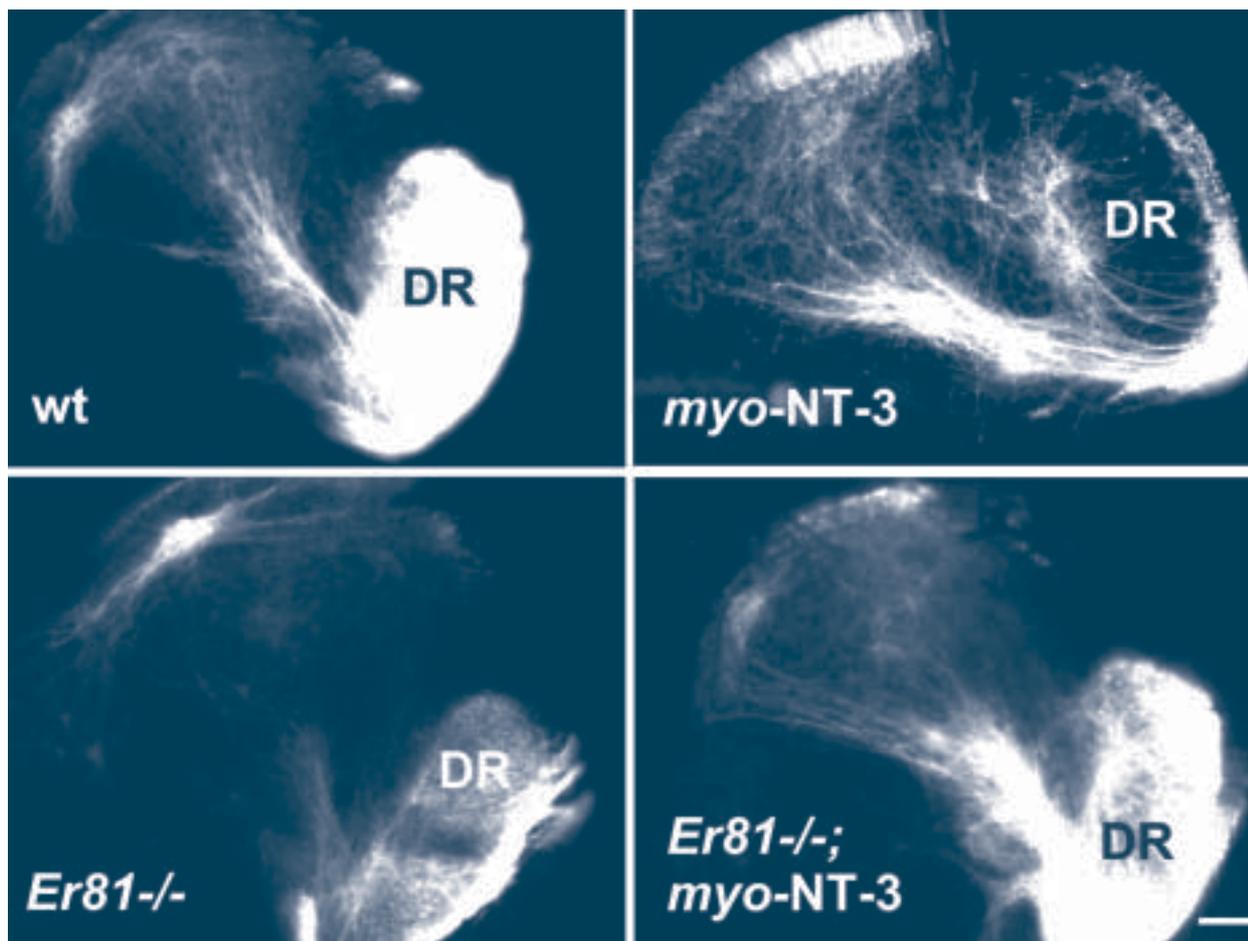
U *Er81(-/-)* mutantních myší jsme v segmentech L_2 - L_5 pozorovali podobně jako Arber *et al.* ('00) výraznou redukci počtu projekcí proprioceptivních Ia neuronů k motoneuronům. Navíc se ukázalo, že redukce počtu vykazuje určitý gradient. V segmentu L_5 byl úbytek vyjádřen nejméně, v segmentu L_2 nejvíce (obr. 1).

V úrovni segmentu L_2 (obr. 2) a v segmentu L_4 (obr. 3) byla u *Er81(-/-);myoNT-3* dvojitého mutant hustota projekcí srovnatelná s kontrolou. Toto zjištění ukazuje, že nadexpese NT-3 ve svalu vede k zachování projekcí, které jsou výrazně redukovány u *Er81(-/-)*. U samotné *myo-NT-3* byla denzita projekcí jen lehce zvýšena.

Diskuse

Zjištěný gradient v hustotě projekcí v segmentech L_2 - L_5 u *Er81(-/-)* myši dobře koreluje s údaji o změnách v počtu vřetének v různých skupinách končetinových svalů.

U *Er81(-/-)* mutantní myši byla zjištěna velmi významná redukce v počtu svalových vřetének v proximálních svalech končetin, které jsou inervovány z kranálních segmentů míchy, kdežto v distálních svalech, inervovaných z kaudálních segmentů, bylo nalezeno zvýšené množství vřetének (Kucera *et al.*, 2002).



OBR. 2. PROJEKCE NEURONŮ SPINÁLNÍHO GANGLIA L2 K MOTONEURONŮM U *ER81(-/-)*, *MYO-NT-3* A *ER81(-/-);MYO-NT-3* MUTANTNÍMI KMENY MYŠÍ V POROVNÁNÍ S KONTROLOU (WT). DR – DORSÁLNÍ ROH. MĚŘÍTKO – 100 μ M.

Zjistili jsme, že nadměrná exprese *NT-3* ve svalu zabrání ztrátě projekcí sensitivních Ia neuronů k motoneuronům podmíněné absencí *Er81(-/-)*. Molekulární mechanismus této kompenzace není zatím jasný. Předpokládáme, že nadexprese *NT-3* ve svalu aktivuje v Ia neuronech některý z dalších genů ETS rodiny, který zastoupí chybějící transkripční faktor ER81. Tuto možnost naznačuje zjištění, že již samotná exprese *Er81* je podmíněna působením *NT-3* (Patel *et al.*, 2003, v tisku). Předběžná zjištění ukazují i paralelní změny v počtu svalových větének ve svalech této dvojité mutantní myši.

Detailní analýza změn v počtu větének bude předmětem další studie, která bude zároveň pomocí elektrofyziologických metod charakterizovat odpovídající změny motoriky a umožní posoudit funkceschopnost zachráněných projekcí. Zvýšená doba přežívání těchto mutant dovoluje předpokládat jejich funkčnost.

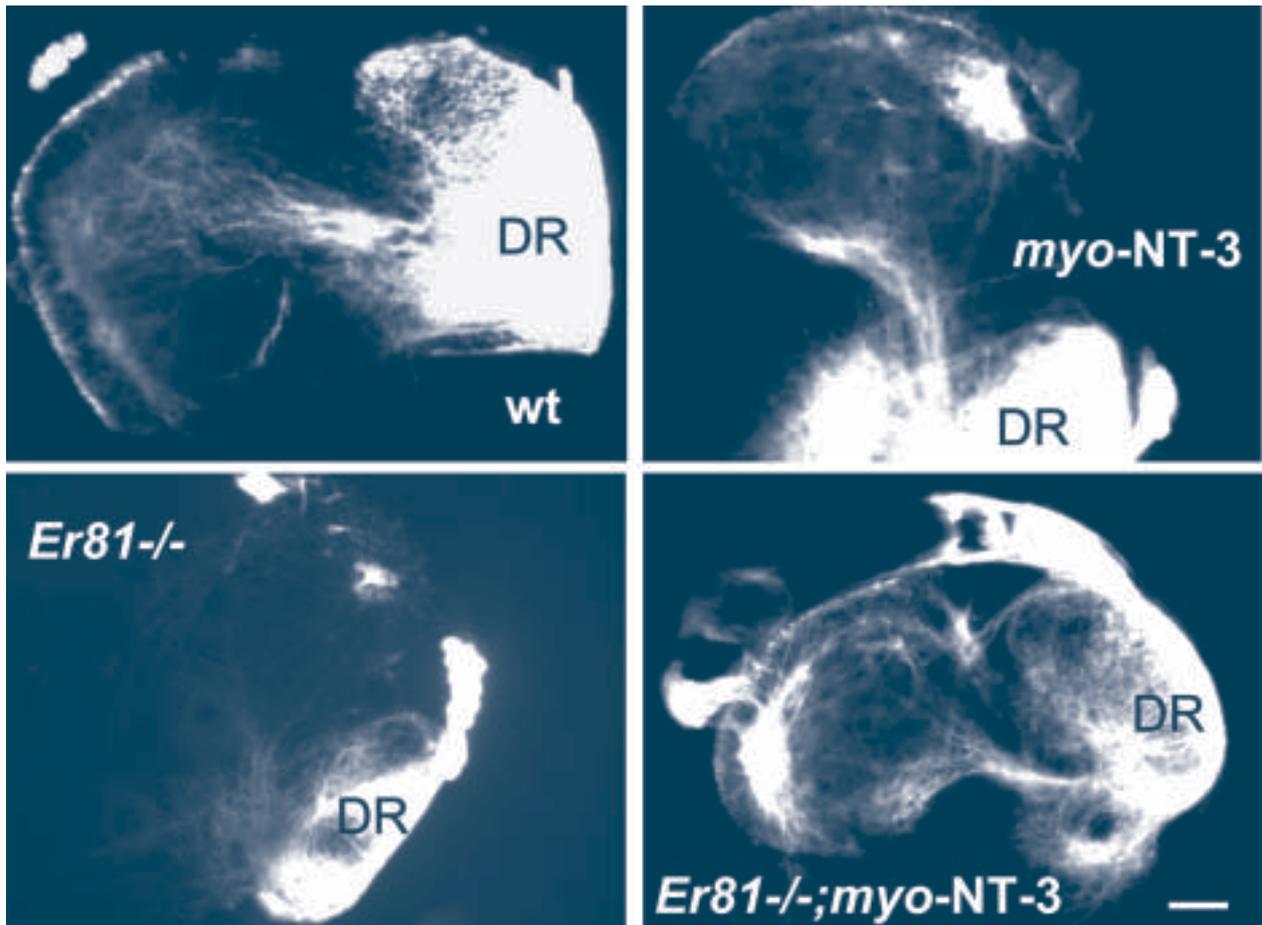
Závěr

Nadexprese *NT-3* v kosterních svalech dvojité mutantní *Er81(-/-);myo-NT-3* myši zabrání ztrátě projekcí sensitivních Ia neuronů k motoneuronům podmíněné absencí transkripčního faktoru ER81. Tento poznatek, který představuje hlubší poznání molekulárního mechanismu tvorby projekcí mezi aferentními neurony a motoneurony, naznačuje možnost použití neurotrofinů v terapii poruch míšní motoriky.

Poděkování

Podpořeno z projektu IBN-007722 (JK) a VZ 111100003-3 (MG). Na financování studijního pobytu v Bostonu se zčásti podílela Nadace „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“

Za pomoc a technickou spolupráci děkuji Ch. Nguyen, B. Nguyen, E. Poundovi (Boston) a E. Kluzákové, M. Pleschnerové, A. Kautské (Praha)



OBR. 3. PROJEKCE NEURONŮ SPINÁLNÍHO GANGLIA L4 K MOTONEURONŮM U *ER81(-/-)*, *MYO-NT-3* A *ER81(-/-);MYO-NT-3* MUTANTNÍMI KMENY MÝŠÍ V POROVNÁNÍ S KONTROLOU (WT). DR – DORSÁLNÍ ROH. MĚŘÍTKO – 100 μ M.

Literatura

1. Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM. ETS gene *Er1* controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* 101: 485-498, 2000
2. Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R.
3. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 20;77(4):503-12, 1994
4. Ghosh A, Kolodkin AL. Specification of neuronal connectivity: ETS marks the spot. *Cell*. 30;95(3):303-6, 1998
5. Chen HH, Frank E. Development and specification of muscle sensory neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9(4):405-9, 1999
6. Chen HH, Hippenmeyer S, Arber S, Frank E. Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Curr Opin Neurobiol* 13(1):96-102, 2003
7. Kucera J, Cooney W, Que A, Szeder V, Stancz-Szeder H, Walro J. Formation of supernumerary muscle spindles at the expense of Golgi tendon organs in *ER81*-deficient mice. *Dev Dyn* 223:389-401, 2002
8. Lin JH, Saito T, Anderson DJ, Lance-Jones C, Jessell TM, Arber S. Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell* 95:393-407, 1998
9. Wright DE, Zhou L, Kucera J, Snider WD. Introduction of a neurotrophin-3 transgene into muscle selectively rescues proprioceptive neurons in mice lacking endogenous neurotrophin-3. *Neuron* 19(3):503-17, 1997

3. místo

EFFECT OF TOTAL BODY IRRADIATION DOSE TOGETHER WITHG PROPER TININY BETWEEN CYCLOPHOSPHAMIDE AND IRRADIATION ON ENGRAFTMENT OF DONOR CELLS IN EXPERIMENTAL MURINE MODEL OF BONE MARROW TRANSPLANTATION

Autorka: Tereza Pelichovská

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



Tereza Pelichovská

INTRODUCTION: Total body irradiation (TBI) is one of the commonly used modalities in solid malignant tumor treatment. Together with chemotherapeutics, e.g. cyclophosphamide (CY), it is part of the conditioning regimen for hematopoetic stem cell transplantation. However it exerts important undesirable side effects, mainly on lung, kidney, intestinal, myocardial and skin tissue. The interstitial pneumonitis and fibrotic nephropathy are common causes of morbidity and mortality of patiens after bone marrow transplantation. Therefore detailed data on engraftment after TBI/CY conditioning regimen, evaluation of differences after different doses of TBI and investigation of TBI dose imporatnce in the preparation regimen can provide better insight into this problematic area.

MATERIALS AND METHODS:

- Mice. Congenic Ly5.1 and Ly5.2 mice were used as recipients and donors 8 to 10 weeks old.
- Cyclophosphamide was injected i.p. 135mg/kg 7, 5, 2 days before irradiation.
- TBI. 2, 4, 6 or 8 Gy was used as irradiation dose.
- BMT. 2 hrs after irradiation mice were transplanted with $4 \cdot 10^6$ bone marrow cells
- Evaluation of chimerism. % of donor hematopoiesis was measured from peripheral blood using flow cytometry Metod (Beton Dickinson FACScan)

RESULTS:

Effect of TBI on survival of hematopoetic progenitors (CFU-S) in bone marrow within first 24 hrs after irradiation. Fig 1a. In the control group (without pretreatment with cyclophosphamide) there is a degrease in number of CFU-S by cca 20% within first 24 hrs. This phenomenon is called post-irradiation dip. However if CY is administered 2 days prior to irradiation, this dip is abolished and immediate regeneration occurs - Fig1b. But if CY is injected 7 days efore TBI, the postirradiation dip is enhanced and the numer of CFU-S dramatically decreases.

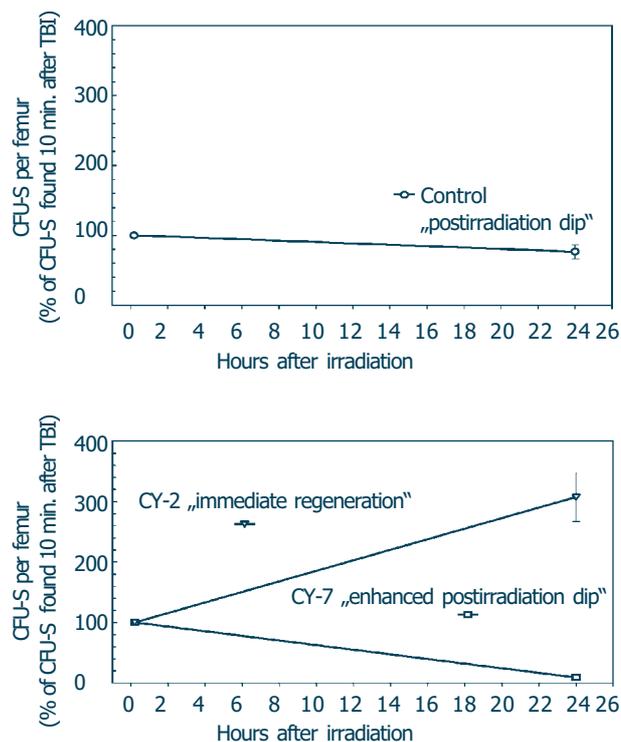


Fig 1

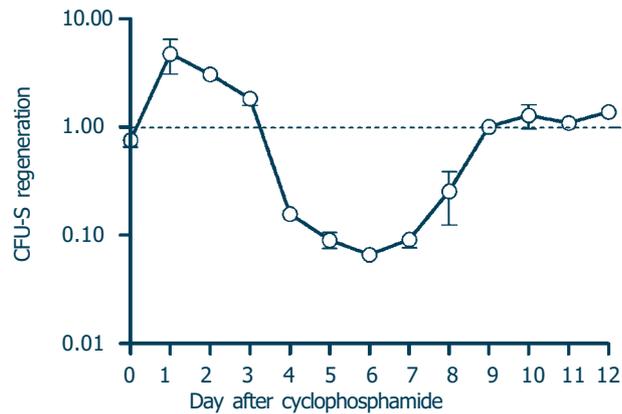


Fig 2

Regeneration after CY administration and TBI. Fig 2 demonstrates an unique pattern in regeneration curve after CY administration and TBI. If CY is administered 2 to 3 days before TBI, regeneration occurs and number of CFU-S grows. But if CY is administered 5 to 7 days before TBI, the regeneration is strongly depressed. This follow-up is valid for TBI dose from 1 to 8 Gy.

Engraftment after different timing between CY and TBI in preparation regimen. Fig 3 shows chimerism (% of donor hematopoiesis) after different timing between CY and TBI. Control group, which didn't receive any CY pretreatment reached level of stable chimerism at cca 30%. If CY was administered 2 days prior to TBI, the % of chimerism in short-term engraftment was significantly lower and only after 4 months reached values of the control group. However extending the time interval between CY and TBI to 5 to 7 days leads to significantly high chimerism reaching values of "more than 85%".

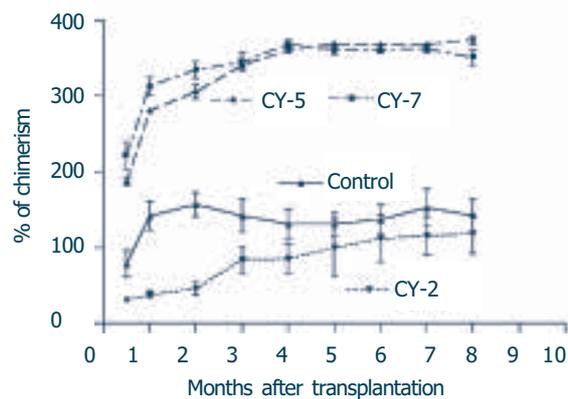


Fig 3

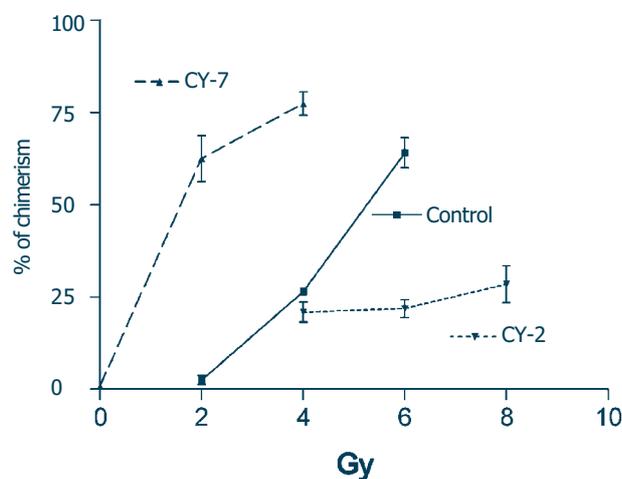


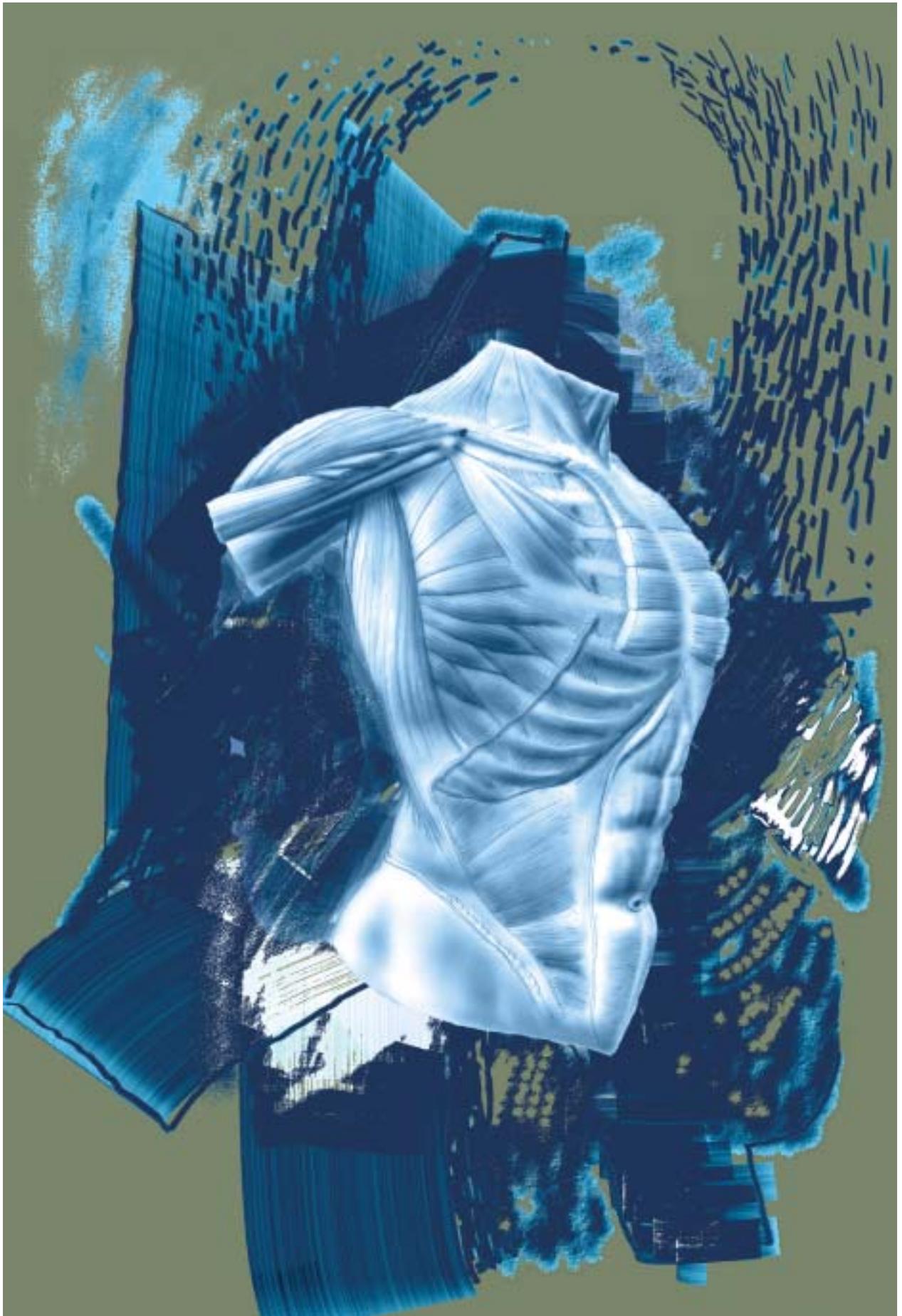
Fig 4

Effect of different TBI doses and different time interval between CY and irradiation. Fig 4. In the control group (that was only irradiated), there is a linear relationship between irradiation and engraftment. Increasing TBI dose leads to higher engraftment, reaching 60% when using 6 Gy of irradiation. In the group pretreated with CY 2 days before TBI increasing of irradiation doesn't lead to increasing in engraftment, reaching 25% from the dose 4 to 8 Gy. However when pretreating with CY 7 days before TBI leads to significantly high chimerism reaching 80% with dose of 4 Gy and 65 % with the dose of 2 Gy. But no irradiation doesn't lead to engraftment.

CONCLUSIONS: The regeneration after CY and TBI follows a common pattern for doses from 2 - 8 Gy and depends on time of CY pretreatment, not on TBI dose. Successful engraftment depends on time interval between cyclophosphamide and TBI and enables reduction of TBI dose. Reduction of TBI could cause reduction of undesirable side effects of irradiation. But lack of TBI doesn't lead to engraftment of donor cells after transplantation. From that we can conclude that there is a need of hit of irradiation, there is no need of high dose of irradiation and success of engraftment depends more on timing between CY and TBI.

REFERENCES.

1. Neta R, Okunieff P. : Cytokine-induced radiation protection and sensitization. *Semin Radiat Oncol* 1996 Oct,6(4):306-320
2. Willner J, Vordermark D, Schmidt M, Gassel A, Flentje M, Wirtz H. Secretory activity and cell cycle alteration of alveolar type II cells in the early and late phase after irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003 Mar 1, 55(3):617-25
3. Safwat A, Nielsen OS, El-Badawy S, Overgaard J. Effect of radiation dose rate and cyclophosphamide on pulmonary toxicity after total body irradiation in a mouse model. *Int J Radiat Oncol Biophys* 1996 Jan 1, 34(1):85-91
4. Prevention of radiation -Induced nephropathy and fibrosis in a model of bone marrow transplant by an angiotensin II receptor blocker. Molteni A, Moulder JE, Cohen EP, Fish BL, Taylor JM, Veno PA, Wolfe IF Ward. *Experimental Biology and Medicine* 226:1016-1023 (2001)



SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST

UMÍSTĚNÍ

1. MÍSTO

Šedý Jiří, 5.r.

Školitelé: MUDr. Ondřej Naňka, MUDr. Svatopluk Adámek, CSc.

Název práce:

„Klinická anatomie příštítných žláz.“

2. MÍSTO

Vaňková Zdenka, 5.r.

Školitelé: RNDr. I. Janatková, prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc.

Název práce:

„Diagnostický význam stanovení protilátek proti alfafodrinu.“

3. MÍSTO

Fornůsková Daniela, 4.r.

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.

Název práce:

„Biochemické projevy mitochondriálně kódované mutace v MTAT06 genu.“

3. MÍSTO

Zogala David, 5.r.,

Školitel: doc. MUDr. Jiří Widímský, CSc.

Název práce:

„Prevalence familiárního hyperaldosteronismu v České republice“

1. Místo**KLINICKÁ ANATOMIE PŘÍŠTÍTNÝCH ŽLÁZ****Autor:** Jiří Šedý**Školitelé:** MUDr. Ondřej Naňka, Anatomický ústav 1. LF UK, MUDr. Svatopluk Adámek, CSc., III. chirurgická klinika 1. LF UK a FNM

Jiří Šedý

Úvod. Poloha a počet příštitných žláz (příštitných tělísek) odpovídá podle literárních pramenů jen v 80 % anatomické normě. Zbývající případy se vyznačují variabilitou a jsou zdrojem komplikací při parathyroidektomii (PTE), která je proto náročná na zkušenost operátora. Naším cílem bylo vypracovat optimální postup odběru příštitných žláz pro transplantaci a optimalizovat operační postup při PTE.

Materiál a metodika. Studie byla prováděna na tělech pitvaných v Anatomickém ústavu 1. LF UK a Ústavu patologie 1. LF UK. Preparovali jsme společně s chirurgy 63 těl (29 žen, 34 mužů) ve věku 36 až 92 let. Tělíska jsme identifikovali podle makroskopického vzhledu a nálezu ověřovali mikroskopicky (vzorky z AÚ zpracoval autor, vzorky z Ústavu patologie prim. MUDr. Ivana Vítková).

Výsledky. Horní příštitné žlázy se obvykle nacházejí ve vazivu na povrchu štítné žlázy nad zkřížením a. thyroidea inferior (ATI) a n. laryngeus recurrens (NLR), zatímco dolní leží pod tímto křížením, většinou ventrálně od NLR. Celkem jsme našli a odebrali 237 vzorků, které jsme identifikovali podle vzhledu. Nenalezli jsme 15 tělísek (6 %). Mikroskopické ověření 237 vzorků ukázalo příštitnou žlázu v 71,8 %. Nejčastěji byla zaměněna za lymfatické uzliny (8,7 %) nebo za lalůček štítné žlázy (6,3 %). Tuková tkáň byla nalezena ve 6 % a tkáň thymu v 1,2 %. Mezi horními a dolními tělísky a pravou a levou stranou nebyl zaznamenán rozdíl v úspěšnosti identifikace.

Diskuse. Anatomická variabilita a záměna příštitných tělísek za okolní útvary jsou zdrojem komplikací výkonu. Při PTE je ve specializovaných centrech udávána až 95 % úspěšnost. To je více než v našem souboru (71,8 %). Preparace hypertrofických tělísek je ovšem snazší a je usnadněna použitím předoperačních zobrazovacích metod, které umožní lokalizovat až 80 % tělísek.

Závěr. Ze studie vyplývají tato doporučení: vypreparovat a šetřit NLR a pak nalézt jeho zkřížení s ATI – v okruhu do 2 cm od tohoto místa leží většina tělísek. Pokud nejsou tělíska nalezena, preparovat dále ve vazivu podél průběhu ATI a NLR, na zadní ploše štítné žlázy, v tukové tkáni a v krčních výběžcích thymu. Je třeba vzít v úvahu variabilitu průběhu cév a nervů této krajiny. Nácivk v pitevně přispívá k erudici operátora.

Podpořeno z grantu IGA MZ ND 6856-3 (SA)

Úvod

Příštitné žlázy (příštitná tělíska) jsou čtyři drobné útvary uložené v blízkosti glandula thyroidea (obr. 1, 2). Produkují parathormon, který reguluje hladinu kalcia a fosforu v krvi. Jejich velikost je okolo 4 mm. Počet je v 80-85 % konstantní (Shields et al., 1991), ale může se pohybovat od 1 do 12 tělísek. V 10 % lze nalézt pouze tři tělíska, v 5 % se jich vyskytuje pět. Ostatní odchylky v počtu jsou vzácné.

Horní příštitné žlázy se nejčastěji nacházejí ve vazivu na povrchu štítné žlázy nad zkřížením a. thyroidea inferior (ATI) a n. laryngeus recurrens (NLR). Žlázy jsou zde součástí vazivové tkáně spojující zadní povrch štítné žlázy s pharyngem. Umístění dolních žláz je variabilnější.

Leží pod zkřížením ATI s NLR, většinou ventrálně od NLR (Pyrtek et al., 1964).

Tělíska je však rovněž možno nalézt uvnitř štítné žlázy, v jejím pouzdře, retropharyngeálně, retroesophageálně, v thymu nebo v jeho krčních výběžcích (Clark et al., 1997, Dvořák et al. 1995). Bilaterální symetrii jeví horní tělíska v 80 % a dolní v 70 % (Clark et al., 1997).

Díky této anatomické variabilitě (Wang et al., 1976) je parathyroidektomie (PTE) stále považována za náročný výkon. Nejčastějšími komplikacemi PTE jsou nenalezení či záměna tělísek za jiné tkáně a poranění okolních struktur jako NLR a ATI (Shields et al., 1991).

Cílem naší studie bylo vypracovat optimální postup odběru příštitných žláz pro transplantaci a optimalizovat operační postup při PTE.

Materiál a metodika

Studie byla prováděna na tělech pitvaných v Anatomickém ústavu 1. LF UK a Ústavu patologie 1. LF UK. Preparovali jsme společně s chirurgy 63 těl (29 žen, 34 mužů) ve věku 36 až 92 let.

Provedli jsme límčový řez a doplnili ho incizí ve střední čáře a sternotomií. Po preparaci podkoží jsme protřali krční fascie ve střední čáře a mezi mm. sternohyoidei a mm. sternothyroidei jsme pronikli ke štítné žláze. Tupě jsme odpreparovali svaly od pouzdra štítné žlázy. Uvolněné laloky jsme pak odklopili mediálně. Vodítkem k vyhledání příštítných žláz bylo křížení a. thyroidea inferior a n. laryngeus recurrens (obr. 3). Pokud jsme nenalezli tělíška v této lokalizaci, pokračovali jsme s preparací na zadní ploše štítné žlázy, podél průběhu NLR a ATI, v oblasti krčních výběžků thymu (obr. 2) a předního horního mediastina.

Tělíška jsme identifikovali podle makroskopického vzhledu a nález ověřovali mikroskopicky (vzorky z AÚ zpracoval autor, vzorky z Ústavu patologie prim. MUDr. Ivana Vítková).

Výsledky

Celkem jsme našli a odebrali 237 vzorků, které jsme identifikovali podle vzhledu. Nenalezli jsme 15 tělíšek (6 %). Mikroskopické ověření 237 vzorků (94 %) ukázalo příštítnou žlázu v 181 případech (71,8 %). Nejčastěji byla zaměněna ve 22 případech (8,7 %) za lymfatickou uzlinu, v 16 případech (6,3 %) za lalůček štítné žlázy, v 15 případech (6 %) za tukovou tkáň a ve 3 případech (1,2 %) byla nalezena tkáň thymu. Mezi horními a dolními tělíšky, ani mezi pravou a levou stranou nebyly zaznamenány rozdíly v úspěšnosti identifikace. U žádného jedince jsme nenalezli více než čtyři tělíška.

V rámci studia odchylek od anatomické normy jsme našli dolní pól levého laloku štítné žlázy, zásobený z pravé a. thyroidea inf., vysoké štěpení truncus brachiocephalicus nad úroveň dolního pólu štítné žlázy a levý krční výběžek thymu lokalizovaný za vena brachiocephalica sin.

Se vzrůstajícím počtem provedených odběrů jsme pozorovali zvyšující se úspěšnost identifikace.

Diskuse

Poloha a počet tělíšek je variabilní a snadno mohou být zaměněna za jinou tkáň.

V úspěšné identifikaci hraje rozhodující roli zkušenost chirurga. Ve specializovaných centrech je udávána až 95 % úspěšnost, což je více než v našem souboru (71,8 %).

Zřejmě k ní přispívají nálezy předoperačních zobrazovacích metod, které umožní lokalizovat až 80% tělíšek. Kromě toho je preparace hypertrofických tělíšek snazší. Definitivní ověření úspěšnosti je založeno na výsledku peroperační biopsie

Údaj o 6 % nenalezených tělíšek vychází z předpokladu o přítomnosti čtyř tělíšek u každého pitvaného. Je třeba poznamenat, že ani v jednom případě nebyl počet tělíšek vyšší než čtyři, zatímco v patnácti případech jsme u jednoho jedince identifikovali pouze tři útvary.

Záměna tělíšek za okolní útvary je dána velikostí, tvarem a zabarvením okolních struktur. Na rozdíl od příštítných žláz je lymfatická uzlina tužší a elastičtější. Samostatně vyčnívající lalůček štítné žlázy lze nalézt v místě hledaného tělíška. Tkáň štítné žlázy však zpravidla bývá světlejší než tělíška. K záměně za tukovou tkáň či tkáň thymu dochází nejčastěji při rozšířené preparaci v důsledku nenalezení tělíšek ve standardní lokalizaci. Tuková tkáň i thymus mohou někdy svou barvou imitovat tělíško. Nemají však cévní stopku ani pouzdro.

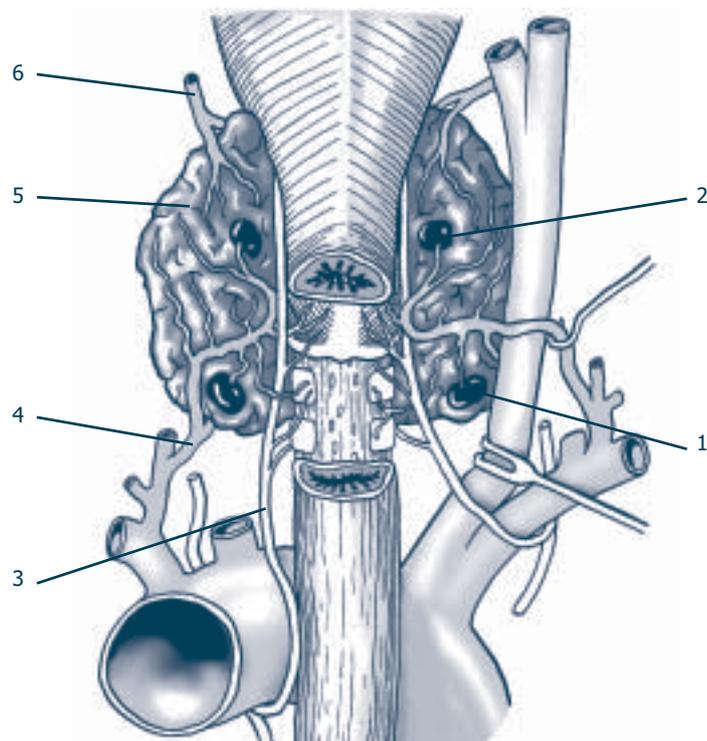
Závěr

Na základě naší studie doporučujeme vypreparovat a šetřit NLR a pak nalézt jeho zkřížení s ATI. V okruhu 2 cm od tohoto místa je uložena většina tělíšek.

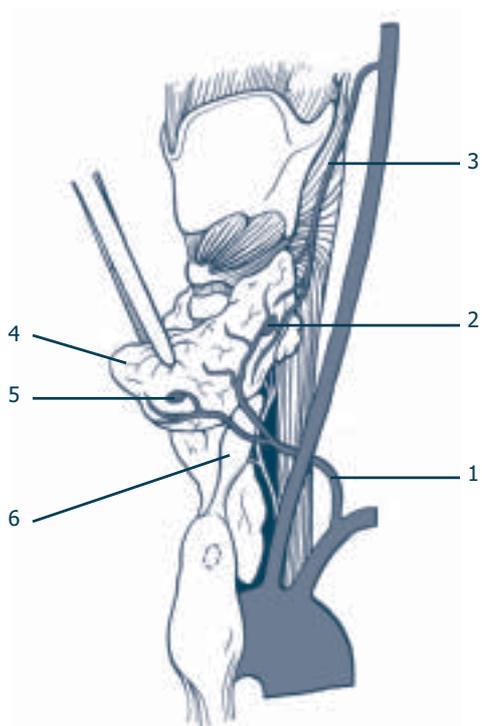
V případě neúspěchu je třeba preparovat dále ve vazivu podél průběhu ATI a NLR, ve vazivovém pouzdru na zadní ploše štítné žlázy, v tukové tkáni při dolním okraji štítné žlázy a v krčních výběžcích thymu. Rovněž je třeba vzít v úvahu časté anatomické variety cév, nervů a štítné žlázy v této krajině. Nácvik preparace v pitevně rozšiřuje zkušenost operátora.

Podpořeno grantem IGA MZ ND 6856-3

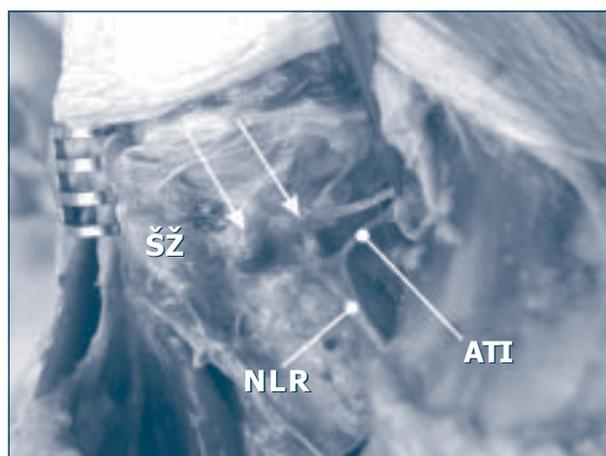
Poděkování prim. MUDr. Ivaně Vítkové z Ústavu patologické anatomie 1. LF UK za mikroskopickou identifikaci vzorků.



OBR. 1. POHLED NA PŘÍŠTÍTNÁ TĚLÍSKA Z DORSÁLNÍ STRANY. 1 – GLANDULA PARATHYROIDEA INFERIOR, 2 – GLANDULA PARATHYROIDEA SUPERIOR, 3 – N. LARYNGEUS RECURRENS, 4 – A. THYROIDEA INFERIOR, 5 – GLANDULA THYROIDEA, 6 – A. THYROIDEA SUPERIOR



OBR. 2. POHLED NA PŘÍŠTÍTNÁ TĚLÍSKA Z LATERÁLNÍ STRANY. 1 – A. THYROIDEA INFERIOR, 2 – GLANDULA PARATHYROIDEA SUPERIOR, 3 – A. THYROIDEA SUPERIOR, 4 – GLANDULA THYROIDEA, 5 – GLANDULA PARATHYROIDEA INFERIOR, 6 – KRČNÍ VÝBĚŽEK THYMU



OBR. 3. POHLED NA GLANDULAE PARATHYROIDEAE (ŠÍPKY) PO VYPREPAROVÁNÍ. ŠŽ – ŠTÍTNÁ ŽLÁZA, NLR – N. LARYNGEUS RECURRENS, ATI – A. THYROIDEA INFERIOR

Literatura

1. Clark O., Duh Q. *Textbook of Endocrine Surgery*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1997
2. Dvořák J. *Chirurgická anatomie a technika operací štítné žlázy*. Dům medicíny. Praha, 1995
3. Pyrtek LJ, Painter RL. *Anatomic study of the relationship of the parathyroid glands to the recurrent laryngeal nerve.* *Surg Gynecol Obstet* 119:509, 1964
4. Shields TW. *Mediastinal surgery*. Lea & Febiger, Philadelphia. 1991
5. Wang CH. *The anatomic basis of parathyroid surgery.* *Ann Surg* 183, 1976

2. místo

**DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ
PROTILÁTEK PROTI Á-FODRINU**

Autorka: Zdenka Vaňková, 5.ročník

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

Zdenka Vaňková

1. Úvod

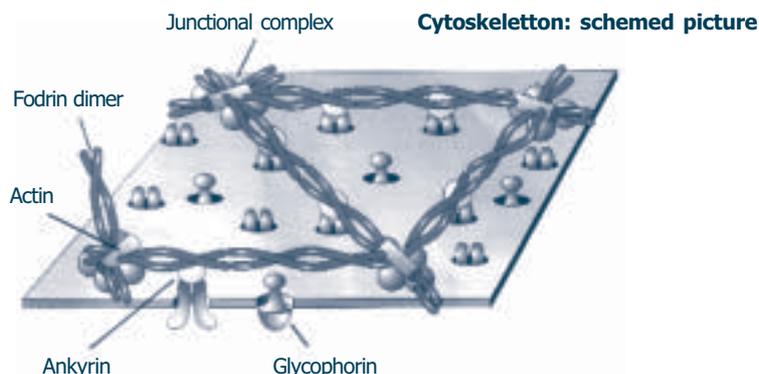
Sjögrenův syndrom představuje skupinu autoimunitních onemocnění, jež jsou charakterizovány společnými chorobnými projevy. Jedná se o pomalu postupující zánětlivá onemocnění postihující především exokrinní žlázy, které jsou infiltrovány lymfocyty. Charakteristická je produkce anti-SSA/Ro a anti-SSB/La autoprotilátek. Nejdůležitější klinické projevy zahrnují xerostomii, xeroftalmii, zvětšení slinných žláz (*sicca syndrom*), atrofickou gastritidu, neerozivní polyartritidu a postižení vnitřních orgánů. Nemocní se SS mají zvýšené riziko lymfoidní malignity. SS se dělí na *primární* (*Sjögrenova choroba*) a *sekundární*, asociovaný s jinými autoimunitními chorobami.

Stanovit správnou diagnózu SS je poměrně obtížné z několika důvodů. Hlavní klinické příznaky, suchost očí i úst, jsou častými subjektivními stesky mnoha pacientů. Také testy hodnotící objektivní známky suchosti očí a úst nejsou ani dostatečně senzitivní, ani dostatečně specifické. Dokonce i biopsie slinné žlázy je pouze v 80% senzitivní a navíc její hodnocení do značné míry záleží na zkušenosti chirurga i patologa hodnotícího vzorek⁽¹⁾. Ani sérologické nálezy, z nichž hlavní jsou anti-SSA/Ro a anti-SSB/La, nejsou pro SS dostatečně specifické a jsou často přítomné i u pacientů se SLE nebo RA. Dosud tedy neexistuje žádný dostatečně senzitivní i specifický sérologický marker pro tuto diagnózu.

V poslední době se však objevily zprávy o možném využití protilátek proti á-fodrinu v diagnostice SS a dosavadní výsledky naznačují, že by se mohlo jednat o tolik postrádaný marker, který by napomohl např. v diferenciální diagnóze SS a SLE.

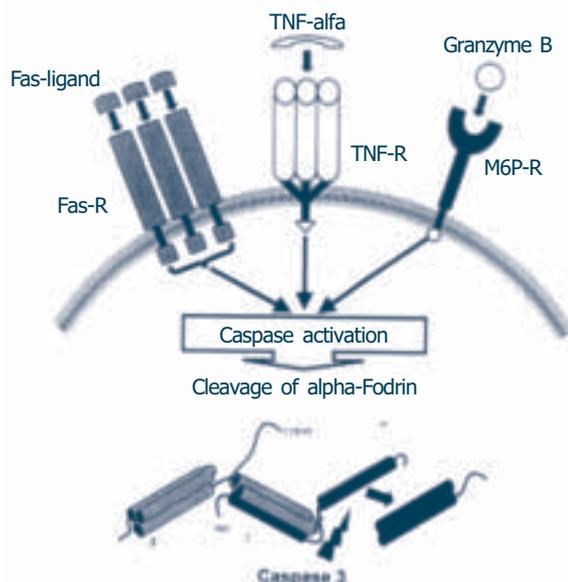
V roce 1997 bylo zjištěno, že sérum od NFS/sld myši po provedené thymektomii ve věku 3 dny - modelů lidského SS – reagovalo s proteinem o molekulové váze 120 kDa, který byl následně zkoumán a identifikován jako štěpný produkt á-fodrinu, specificky exprimovaný v postižených slinných žlázách⁽²⁾.

Fodrin je hlavní komponentou membránového cytosketu většiny eukaryotických buněk (viz.obr.1) a spekuluje se o jeho možné úloze v exokrinní sekreci, ukázalo se totiž, že je asociován s membránovými iontovými kanály a pumpami. Je to heterodimer tvořený podjednotkou á (240 kDa) a β (235 kDa). Tyto heterodimery se mohou sdružovat v tetramery, které se váží na aktin, kalmodulin a mikrotubuly⁽³⁾. Molekuly á-fodrinu mají vysoce konzervovanou strukturu u jednotlivých živočišných druhů.



OBR.1: SCHÉMA MEMBRÁNOVÉHO CYTOSKELETU (MOLEKULA FODRINU ZNÁZORNĚNA ČERVENĚ).

Podjednotka á je v buňkách infikovaných virem EBV těsně před navozením apoptózy degradována na produkty o váze 120 kDa a 150 kDa⁽³⁾. Na indukci apoptózy se podílí různé stimuly – TNF-á, interakce Fas – FasL nebo granzym B (viz.obr.2). Proteolýza je pravděpodobně prováděna kaspázou 3 a cysteinovou proteinázou závislou na Ca^{2+} (calpain I)^(3,4). Nadměrná tvorba tohoto enzymu se diskutuje rovněž v mechanismu patogeneze RA. Není tedy překvapující, že á-fodrin, substrát pro calpain I, se podílí na rozvoji SS.



OBR.2: SCHÉMA APOPTÓZY MOLEKULY ALFA-FODRINU

Existují určité důkazy, že 120kDa fragment á-fodrinu hraje kritickou roli ve vývoji exokrinopatie. Autoprotilátky reagují pouze s tímto štěpným produktem, ne s celou molekulou á-fodrinu. Protože tento fragment vzniká za účasti kaspázy 3, inhibice tohoto enzymu u myši skutečně zabránila vzniku SS⁽³⁾. Důkazy pro úlohu á-fodrinu v patogenezi jsou: 1. indukuje T-buněčnou odpověď a produkci cytokinů Th1 buňkami; 2. imunizace novorozeneých myšek tímto proteinem u nich zabránila vývoji SS; 3. séra pacientů s primárním SS (v 95%) i sekundárním SS (v 65%) reagovala s tímto antigenem v imunoblotové metodě, zatímco séra pacientů se SLE, RA i zdravých kontrol byla negativní⁽²⁾.

Je známo, že pacienti se SS trpí projevy xerostomie, i když byla pouze malá část tkáně postižena chronickým zánětem. Příčina tohoto jevu je nejasná, ale možné vysvětlení nabízí á-fodrin. Bylo dokázáno, že fragmenty fodrinu jsou lokalizovány v apikální membráně acinárních epiteliálních buněk, zatímco intaktní molekuly se nachází v periferní cytoplasmě. Je možné, že protilátky proti á-fodrinu zhoršují funkci iontových kanálů a pump a tím navozují dysfunkci sekrečních žláz⁽³⁾. Dále tyto protilátky blokují vedení nervových vzruchů zejména přes glutamátové synapse, a tak interferují s nervovými impulzy regulujícími sekreci.

Mnohé studie se v posledních letech zabývaly otázkou, nakolik specifické protilátky proti á-fodrinu jsou a porovnáním těchto protilátek ve třídě IgG a IgA. Výsledky se většinou shodují a uvádějí ve třídě IgA senzitivitu přes 60%, specificitu přes 90%⁽¹⁻⁴⁾. Navíc koncentrace protilátek korelovala se stupněm lymfocytární infiltrace slinných žláz⁽³⁾.

Studie japonských autorů u dětských pacientů se SS, juvenilním SLE nebo juvenilní RA prokázaly, že na rozdíl od dospělých byly u těchto pacientů protilátky proti á-fodrinu přítomny nejen u pacientů se SS (3/3), ale i JRA (5/9) a SLE (5/6) bez jakékoli známky sekundárního SS⁽⁵⁾ a že tedy v dětském věku postrádají specificitu dospělého věku.

Lze shrnout, že protilátky proti á-fodrinu se z dosavadních výsledků uváděných v literatuře jeví jako hodnotný marker v diagnostickém postupu u SS.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit, zda protilátky proti á-fodrinu mají diagnostický význam u keratokonjunktivitidy a xerostomii při Sjögrenově syndromu, jestli skutečně mohou posloužit jako dlouho hledaný dostatečně senzitivní a zároveň specifický laboratorní marker pro toto onemocnění a zda se přímo účastní patogeneze difúzního chronického zánětu slinných a slzných žláz.

3. Materiál a metodika

Celkem bylo vyšetřeno 81 vzorků sér. Séra byla rozdělena do 4 skupin (3 skupiny pacientů a 1 skupinu kontrolních vzorků): skupina A: pacienti se Sjögrenovým syndromem (n=11, z toho se 9x jednalo o primární a 2x sekundární SS); skup.B: pacienti se systémovým či orgánovým autoimunitním onemocněním, kromě SS (n=21, 10xSLE, 3x antifosfolipidový syndrom, 2x overlap syndrom, 2x MCTD, 2x prim.vaskulitis, 1x RA, 1x sklerodermie); skup.C: pacienti s ústním dyskomfortem, bez prokázaného systémového a/nebo orgánového autoimunitního onemocnění (n=18); skup.D: zdravé kontroly (n=31), u nichž rutinním laboratorním vyšetřením nebyla zjištěna přítomnost autoprotiátek.

Pacienti se SS splňovali tato diagnostická kritéria: 1. suchá keratokonjunktivita, potvrzeno Schirmerovým testem; 2. xerostomie, potvrzeno sialometrickým testem dle Škacha; 3. laboratorní průkaz vysokých titrů RF, ANAb a ENA SS-A a SS-B.

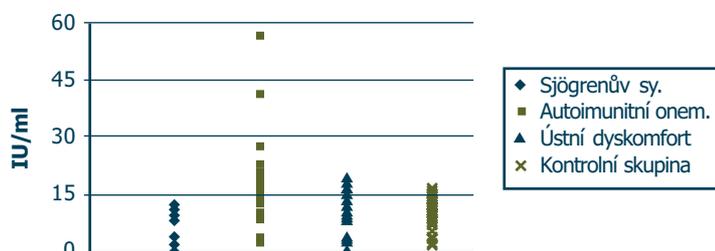
Pro stanovení protilátek proti á-fodrinu byla použita metoda enzymové imunoanalýzy (ELISA) s rekombinantním lidským alfa-fodrinem, stanovující protilátky ve třídě IgG a IgA (komerční sada fy.Aesku.lab Diagnostika – Aeskulisa á-Fodrin-A a G (dodává BioVendor Brno)).

Vzorky sér byly naředěny v poměru 1:101 a inkubovány v mikrotitrační destičce s navázaným antigenem. Pokud je v séru přítomna hledaná protilátka, naváže se na antigen. Nenavázané protilátky jsou odmyty. V další fázi je přidán konjugát – protilátky proti lidským Igl s navázanou peroxidázou. Po inkubaci se nenavázaný konjugát odmyje. Po přidání substrátu dochází k enzymatické kolorimetrické reakci (modrá barva), která je zastavena ředěnou kyselinou (žlutá barva). Intenzita zabarvení, kterou odečítá automatický reader, je úměrná původnímu množství protilátky ve stanovovaném vzorku. Jako pozitivní byly hodnoceny vzorky s koncentrací protilátek proti á-fodrinu více než 15 IU/ml (doporučení výrobce).

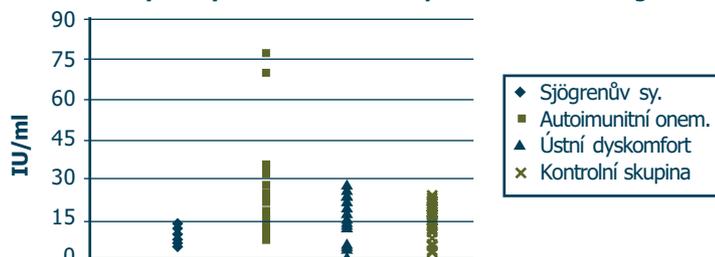
Ostatní autoprottilátky (ANAb, ENA screening, SS-A a SS-B) byly stanoveny v rutinním provozu imunologické laboratoře ÚIM 1.LF UK.

4. Výsledky

Souhrnné výsledky stanovení anti-AF protilátek ve třídě IgA



Souhrnné výsledky stanovení anti-AF protilátek ve třídě IgG



TAB.1: VÝSLEDKY U PACIENTŮ SE SS (SKUP.A).

Poř.č.	Žena/muž	Věk	Diagnóza	Anti-AF IgG	Anti-AF IgA
1	ž	40	SS	10,919	8,483
2	ž	31	SS	10,904	11,4
3	ž	54	SS	9,864	9,516
4	ž	41	SS	5,26	3,661
5	ž	59	SS	14,505	2,203
6	ž	56	SS	14,207	10,549
7	ž	49	SLE, sek.SS	10,287	10,402
8	ž	53	SS	14,188	9,293
9	ž	34	SS	10,739	11,609
10	ž	49	SS	5,963	8,261
11	ž	45	myasthenia gravis, SS	6,273	0

SEKCE PREGRADUÁLNÍ - klinická část

TAB.2: VÝSLEDKY U PACIENTŮ SE SYSTÉMOVÝM A/NEBO ORGÁNOVÝM AUTOIMUNITNÍM ONEMOCNĚNÍM (SKUP.B)

Poř.č.	Žena/muž	Věk	Diagnóza	Anti-AF IgG	Anti-AF IgA
1	ž	34	SLE	12,78	17,432
2	ž	27	prim.vaskulitis	21,832	21,325
3	ž	47	overlap sy	9,467	12,967
4	m	27	antifosfolipidový sy	15,782	16,859
5	ž	25	SLE	33,181	41,094
6	m	54	SLE	76,532	56,439
7	ž	17	antifosfolipidový sy	14,508	14,118
8	m	70	susp.prim.vaskulitis	33,703	11,937
9	ž	18	SLE	26,383	14,499
10	ž	28	SLE	23,794	18,813
11	ž	34	SLE lupoidní nefritis	8,237	8,653
12	ž	46	MCTD	12,49	10,224
13	ž	40	SLE lupoidní nefritis	32,243	2,514
14	ž	53	MCTD	8,243	3,579
15	ž	39	RA	11,287	10,828
16	ž	26	sklerodermie	12,677	9,296
17	ž	14	SLE	35,506	10,958
18	ž	17	SLE	11,386	9,136
19	ž	32	overlap sy	18,235	11,07
20	ž	34	antifosfolipidový sy	69,318	22,707
21	m	19	SLE	26,79	27,416

TAB.3: VÝSLEDKY U PACIENTŮ S ÚSTNÍM DYSKOMFORTEM (SKUP.C).

Poř.č.	Žena/muž	Věk	Anti-AF IgG	Anti-AF IgA
1	m	41	9,772	8,422
2	m	49	12,58	10,113
3	m	50	12,94	11,591
4	ž	69	6,071	2,883
5	m	54	3,759	8,981
6	ž	39	6,693	11,752
7	ž	54	8,648	19,661
8	ž	35	13,597	15,955
9	m	40	12,143	11,401
10	ž	39	4,015	3,44
11	ž	54	12,69	10,939
12	ž	60	3,428	0
13	ž	60	6,984	9,067
14	ž	38	13,532	10,395
15	m	43	8,388	14,56
16	ž	25	10,373	12,879
17	m	45	10,999	11,983
18	ž	51	10,844	10,747

TAB.4: VÝSLEDKY U ZDRAVÝCH JEDINCŮ (SK.D).

Poř.č.	Žena/ muž	Věk	Anti-AF IgG	Anti-AF IgA
1	ž	24	7,969	7,419
2	m	69	13,708	11,155
3	ž	90	14,646	11,806
4	ž	27	7,847	3,594
5	m	39	6,552	11,325
6	ž	51	11,022	2,019
7	ž	27	14,425	8,964
8	ž	45	23,253	15,125
9	ž	33	10,094	13,892
10	m	67	7,55	15,369
11	ž	32	12,212	10,325
12	ž	33	7,209	1,919
13	ž	26	24,499	15,816
14	ž	40	16,841	14,966
15	ž	30	32,297	16,129

Poř.č.	Žena/ muž	Věk	Anti-AF IgG	Anti-AF IgA
16	ž	12	13,309	14,6
17	ž	57	8,5	11,152
18	ž	36	6,213	10,082
19	ž	49	6,694	2,117
20	ž	37	6,519	9,592
21	ž	25	9,37	12,44
22	ž	27	8,071	8,151
23	m	58	13,309	11,416
24	ž	44	11,857	11,945
25	ž	50	7,051	3,299
26	ž	61	0,885	3,81
27	ž	45	9,522	12,414
28	ž	16	2,893	7,449
29	ž	46	6,891	8,021
30	m	47	27,96	11,374
31	m	37	47,811	8,314

5. Diskuze

Ve třídě IgG bylo zaznamenáno celkem 17 pozitivních výsledků (z toho 12 ve skup.B, 5 ve skup.D, žádný ve skup. A a C). Ve třídě IgA bylo jako pozitivní stanoveno 14 vzorků (žádný ve skup.A, 8 ve skup. B, 2 ve skup.C a 4 ve skup.D).

Ve skupině nemocných s pokročilým Sjögrenovým syndromem (skup.A) jsem překvapivě našla statisticky významně nižší hladiny protilátek proti alfa-fodrinu ve třídě IgG i IgA než ve skupině nemocných s jinými systémovými a/nebo orgánovými autoimunitními onemocněními (skup.B) ($p < 0,01$ ve třídě IgA, $p < 0,009$ ve třídě IgG). Naproti tomu se koncentrace protilátek proti alfa-fodrinu ve třídě IgG ani IgA u nemocných s pokročilým Sjögrenovým syndromem statisticky významně nelišily od skupiny nemocných s jiným ústním dyskomfortem (sk.C) nebo od zdravých jedinců (sk.D).

Vysoké titry protilátek proti alfa-fodrinu u systémových/orgánových autoimunit nasvědčují tomu, že tyto autoprotiilátky by mohly mít v podstatě ochrannou roli, zatímco v případě jednoznačné manifestace sicca syndromu je přítomnost těchto autoprotiilátek „zbytečná“, protože poškození dosáhlo takového stupně (irreverzibility), že ochranná funkce autoprotiilátek se již nemůže uplatnit.

Na základě těchto prvních zjištění se domnívám, že by přítomnost vysokých titrů protilátek proti alfa-fodrinu mohla nasvědčovat možnému poškození exokrinních žláz (slinných a slzných) v budoucnosti - podobně, jako bylo prokázáno u nemocných s DM anebo s autoimunitní thyreoiditidou.

Pro lepší pochopení mechanismů možného poškození slinných a slzných žláz autoprotiilátkami proti alfa-fodrinu by bylo vhodné sledovat dynamiku hladiny protilátek proti alfa-fodrinu u pozitivních pacientů se systémovým a/nebo orgánovým autoimunitním onemocněním, případný rozvoj klinických příznaků SS a korelaci přítomnosti a titru těchto autoprotiilátek s morfoloickým nálezem exokrinních žláz.

V době provedení této práce byla na trhu pouze jediná komerčně dostupná sada pro stanovení protilátek proti alfa-fodrinu. Nyní se však na trhu objevila další, bylo by tedy jistě zajímavé srovnat výsledky dosažené oběma sadami.

Jak vyplývá z výsledků, pozitivní nálezy byly zaznamenány i u skupiny zdravých jedinců, a to více ve třídě IgG. Ve třídě IgA byla u všech 4 pozitivních vzorků jen nepatrně překročena hladina 15 IU/ml, doporučená výrobcem jako cut-off hodnota. Je tedy třeba zvážit, zda by pro příp. rutinní použití stanovení těchto protilátek nebylo vhodné tuto hodnotu posunout. Přítomnost vyšších hladin protilátek u zdravých jedinců ve třídě IgG než ve třídě IgA odpovídá udávané větší specifčnosti stanovení protilátek proti alfa-fodrinu ve třídě IgA.

6. Závěr

Z výsledků vyplývá, že k odhalení SS nestačí stanovení titru protilátek proti á-fodrinu. Stanovení těchto autoprotilátek ale zřejmě má smysl, neboť tyto autoprotilátky mohou mít ochrannou roli a přítomnost vysokých titerů by mohla nasvědčovat možnému poškození exokrinních žláz (slinných a slzných) v budoucnosti.

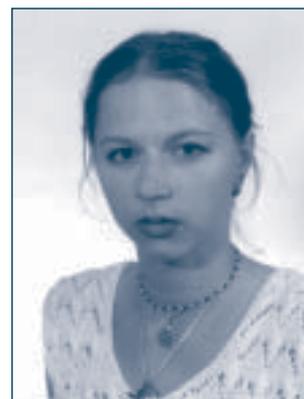
Seznam použité literatury:

1. Witte, T., Matthias, A., Arnett, F.C., Peter, H.H., Hartung K., Sachre C., Wigand, R., Braner, A., Kalden, J.R., Lakomek, H.J., Schmidt, R.E.: IgA and IgG autoantibodies against alpha-phodrin as markers for Sjogren's syndrome, *J Rheumatol* 2000 Nov;27(11):2617-20
2. Haneji, N., Nakanuta, T., Takoi, K., Higashiyama, H., Saito I., Noji, S., Sugino, H., Hayashi, Y.: Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome, *Science* 1997 Apr 25;276(5312):604-7
3. Ulbricht, K., Schmidt, R., Witte, T.: Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome, *Autoimmunity Rev* 2003 Feb; 2: 109-113
4. Watanabe, T., Tsuchida, T., Kanda, N., Mori, K., Hayashi, Y., Tamaki, K.: Anti-alpha-fodrin antibodies in Sjogren syndrome and Lupus Erythematosus, *Arch Dermatol* 1999 May;135(5):535-9
5. Takahashi, K., Tatsuzawa, O., Yanagi, K., Hayashi, Y., Takahashi, H.: Alpha-fodrin auto-antibody in Sjogren syndrome and other auto-immune diseases in childhood, *Eur J Pediatr* 2001 Aug;160(8):520-1
6. Vencovský, J.: Autoimunitní systémová onemocnění – minimum pro praxi, Triton, Praha 1998
7. Klener, P.: Vnitřní lékařství, Galén, Praha 1997
8. Fučíková, T.: Klinická imunologie v praxi, Galén, Praha 1997

3. místo**BIOCHEMICAL EXPRESSION OF MTDNA MUTATION 9205DELTA IN ATP6 GENE**

Autoři: Daniela Fornůsková, M. Tesařová, P. Ješina, A. Vojtíšková, H. Hansíková, J. Houštěk

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



Daniela Fornůsková

Introduction

ATP production by OXPHOS system, localised in the inner mitochondrial membrane, is the essential metabolic pathway in the cell. OXPHOS system is composed of five multisubunit complexes, four of them contain subunits encoded by mtDNA (Figure 1) as well as nDNA. ATP synthase (complex V) catalyses the ATP synthesis of ADP and Pi, the final step of OXPHOS pathway. This synthesis is driven by proton motive force generated by other OXPHOS complexes. ATP synthase comprises a rotary catalytic portion, F1-ATPase, a transmembrane part Fo, and two stalks that link F1 and Fo. Two of the subunits (subunits 6 and 8) of Fo part are encoded by mitochondrial DNA and they are essential for the assembly of the whole complex. Mutations in the *MTATP6* gene lead to severe clinical phenotype.

In the boy with lactate acidosis, we have identified, for the second time (Seneca et al. 1996), microdeletion 9205delTA in mtDNA. This mutation cancels the stop-codon of *MTATP6* and changes the cleavage site between ATPase6 and COIII mRNAs. Here, we present the results of molecular and biochemical study in affected family.

Case report

The boy was born in term from the second uncomplicated pregnancy with birth weight 3 450 g and length 52 cm. Failure to thrive, spastic quadraparesis and microcephalia were observed since the third months of life followed on with practical arrest of any psychomotor development. He is four years old, now. Both parents are healthy, an older brother with fatal infantile encephalopathy and lactic acidosis died due to respiratory failure.

Metabolic investigations revealed intermittent hyperlactacidemia (B-lactate 0.95 – 3.4 mmol/l, controls < 2.1mmol/l) with increased level of lactate and alanine in cerebrospinal fluid (CSF-lactate 4.8 mmol/l, controls <1.8 mmol/l; CSF-alanine 36 mmol/l, controls < 34 mmol/l).

Methods**Sequencing**

Total genomic DNA from muscle and cultured fibroblasts was isolated by phenol extraction. Entire mtDNA was amplified in six overlapping fragments by PCR. Purified fragments were subsequently sequenced using cycle sequencing with 41 cy5-labelled internal sequencing primers.

Restriction analysis, heteroplasmy

To determine the amount of mtDNA containing microdeletion, PCR – RFLP analysis method was developed using the mismatched primers: 5' TAGTA AGGCC TCTAC CTGCA CTACA TCACA (forward) and 5' GTTAC ATCGC GCCAT CATT (reverse) which introduce a novel MspI restriction site in the case of the mutant copies. PCR products were radioactively labeled [³²P]dCTP in additional 5 cycles of PCR and run on a 10% non-denaturing polyacrylamide gel after complete digestion. The proportion of wild – type and mutant mtDNA was measured densitometrically by the Phosphor Imager, using ImageQuant software (Molecular Dynamics).

Spectrophotometry

The activities of respiratory chain complexes, NADH-coenzyme Q₁₀ oxidoreductase (NQR, complex I), succinate-coenzyme Q₁₀ oxidoreductase (SQR, complex II), coenzyme Q₁₀-cytochrome *c* oxidoreductase (QCCR, complex III), cytochrome *c* oxidase (COX, complex IV) and NADH-cytochrome *c* reductase (NCCR, complex I+III), and citrate synthase (CS) were measured spectrophotometrically in isolated muscle mitochondria and cultured skin fibroblasts. Protein was determined by the method of Lowry.

BN-PAGE, 2D electrophoresis

BN-PAGE was used for separation of samples in the first dimension on 6 – 15% polyacrylamide gradient gel. Mitoplast or mitochondria were solubilized with 1% lauryl maltosid at a protein concentration 1 mg/ml. For two-dimensional analysis, strips of the first dimension gel were incubated for 45 min with 1% SDS and 1% b-

mercaptoethanol and then subjected to 10% polyacrylamide SDS-PAGE for separation in the second dimension. The gels were stained with Commassie Brilliant Blue and then by silver staining.

ATP production

The rate of ATP synthesis by digitonized cultured skin fibroblasts was measured as described by Wanders et al, 1993.

Oxygen consumption

The oxygen electrode from OROBOROS, Austria, was used to measure the oxygen consumption of fibroblasts. Oxygen consumption by cultured fibroblasts was determined at 30°C according to Hofhaus et al, 1996.

Western blot

COX and ATPase subunits were detected by Western blot using panel of monoclonal as well as polyclonal antibodies (Houštěk et al, 1999).

Results

Electrophoretic analysis of muscle mitochondrial OXPHOS complexes by BN-PAGE in the first dimension revealed severe decrease in amount of complex V (ATP synthase). The amount of other OXPHOS complexes was unchanged compare to control. No assembly intermediates were present (Figure 2).

Monoclonal antibodies against F1 a - subunit did not detect complex V or unassembled subunits in muscle, but fully assembled complex V and its assembly intermediates were found in fibroblasts. Polyclonal antibody against complex IV disclosed lower amount of cytochrome c oxidase subunits in fibroblasts compare to control.

Sequencing of the whole mitochondrial genome from muscle tissue revealed except several described polymorphisms deletion of two bases TA at position 9205, 9206 resp (Figure 3).

The level of heteroplasmy of this microdeletion was 69% in muscle. 9205delTA was present in fibroblasts (85%) and blood cells (68%) of the patient. This microdeletion was found also in his mother's (64%) and grandmother's (4%) blood (Figure 4).

In isolated muscle mitochondria, spectrophotometrical measurement of activities of respiratory chain complexes revealed a decrease in activity of complex III (residual activity was 54% of the low border of reference range). In cultured fibroblast, extreme decrease in activity of complex IV (residual activity was 13%) and its ratio to CS were observed (Table 1).

Digitonised cultured fibroblast showed decrease in ATP production (residual activity of ATP synthase 20% of control). The endogeneous respiration stimulated by pyruvate, malate succinate and ADP was only 47% of control in patient's fibroblasts (Figure 5).

Discussion and Conclusions

Results of biochemical analysis of patient's fibroblasts and muscle tissue led us to investigation of mitochondrial DNA, especially genes for structural subunits of cytochrome c - oxidase and ATP synthase. Direct sequencing revealed 2-bp-deletion TA at position 9205, 9206. This microdeletion, described in one patient six years ago, causes the loss of stop codon in *MTATP6* gene.

The mtDNA gene expression system produces large polycistronic precursor transcripts. Within these transcripts, tRNA structures function as signals for the RNA processing enzymes that generate the mature rRNA, tRNA and mRNA molecules. Genes for subunits ATP8, ATP6, and COIII are not separated by tRNA (Figure 1). There are probably tRNA-like secondary structures which can be recognized by the processing machinery and two mature mRNAs are released: one for the COIII subunit and the other for polycistronic ATP8 and ATP6 mRNA - contains two overlapping reading frames.

In our patient, the mutation removes part of the translation stop codon of the *MTATP6* gene: ACATAATG → ACAATG and destroys the normal cleavage site. There are currently two possible impacts on protein expression. First, mutation would lead to translation of polyA stretch in posttranscriptionally processed mRNA (Figure 6a). C - end of ATP6 peptid, which normally ends by threonin, would continue by lysin segment. Second, mutation would destroy the normal cleavage site of polycistronic precursor between ATP6 and COIII. This can lead to production of abnormal mature mRNA containing sequences for the ATP8, ATP6 and COIII subunits (Figure 6b). If this mRNA is translated, normal ATP8 and COIII subunits (start codon of the COIII gene is not affected by the mutation) can be produce in addition to the "fusion protein" ATP6 + COIII. The abnormal protein can interfere with the assembly of the fully functional complexes IV (cytochrome c oxidase) and V (ATP synthase).

To elucidate the pathogenic mechanism of 2-bp-deletion 9205-delTA in mtDNA, further investigations are necessary including immunochemical methods and detailed analysis of the transcripts (some of these are currently under investigation).

References

1. Devenish, M. Prescott, X. Roucou, P. Nagley, P (1999) Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1458 (2000): 428 – 442
2. Klement, P., Nijtmans, L.G., van den bogert, C., Houstek, J.: Analysis of oxidative phosphorylation complexes in cultured human fibroblasts and amniocytes by blue native electrophoresis using mitoplasts isolated with the help of digitonin. *Anal Biochem* 1995, 231: 218 – 224.
3. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265 – 275
4. Makinen, M.W., Lee, C.P., Shy, G.M.: Microanalysis of cytochrome content, oxidative and phosphorylative activities of human skeletal muscle mitochondria. *Neurology* 1968, 18: 299.
5. Rustin, P., Chretien, D., Bourgeon, T., et al: Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994, 228(1): 35 – 51.
6. Seneca, M. Abramowicz, W. Lissens, M. F. Muller, E. Vamos, L. de Meirleir (1996) A mitochondrial DNA microdeletion in a newborn girl with transient lactic acidosis. *J Inherit Metab Dis* 19 (2): 115 – 118
7. Schagger, H., von Jagow, G.: Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 1991, 199: 223 – 231.
8. Taanman, J.W. (1998) *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1410 (1999): 103 – 123

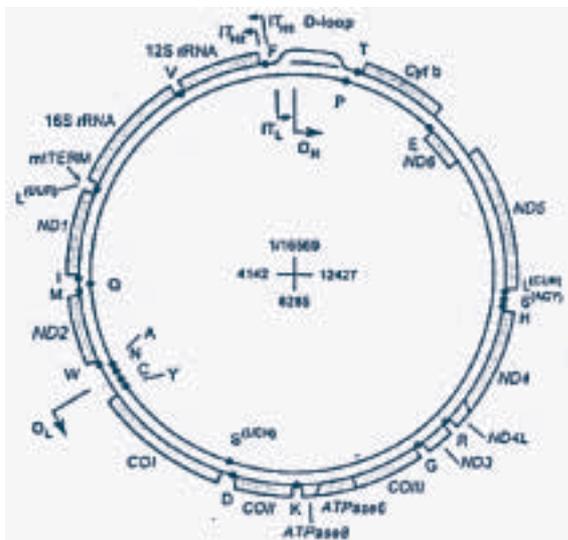


Fig. 1. Map of the human mitochondrial genome 16 569 bp).

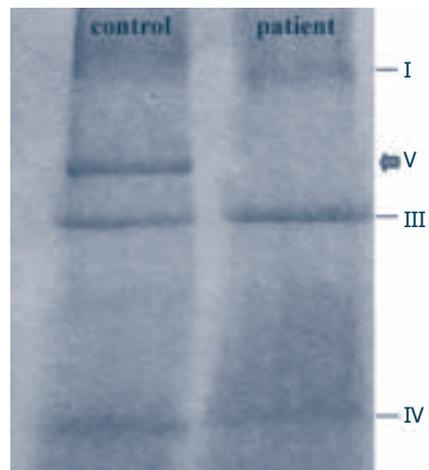


Fig. 2. BN-PAGE of muscle OXPHOS complexes. Separation of samples in the first dimension on 6 – 15% polyacrylamide gradient gel. The gels were stained with Commassie brilliant blue.

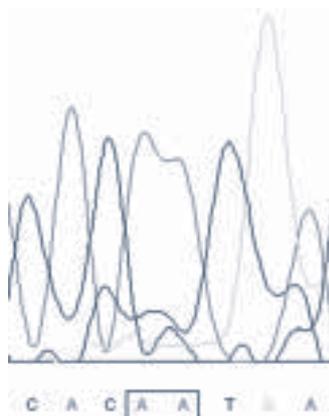


Fig. 3. 2-bp-deletion TA at position 9205, 9206 (between nucleotides in frame). The microdeletion disrupts the stop codon of the ATP6 gene.

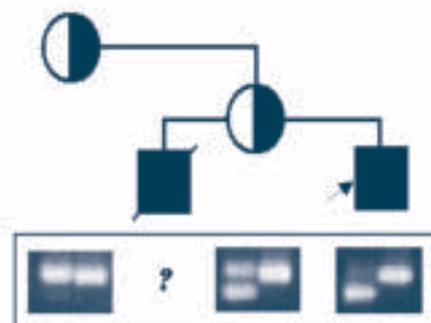


Fig. 4. PCR – RFLP (MslI) analysis of blood. Separation of samples on 2% agarose gel. The DNA was stained with ethidium bromide. Upper band, PCR product (221 bp), represents wild type molecules. Lower band, restriction product (192 bp), represents mutant molecules.
first line – PCR product after digestion MslI; **second line** – undigested PCR product
 ? – there was no genetic material to analyse

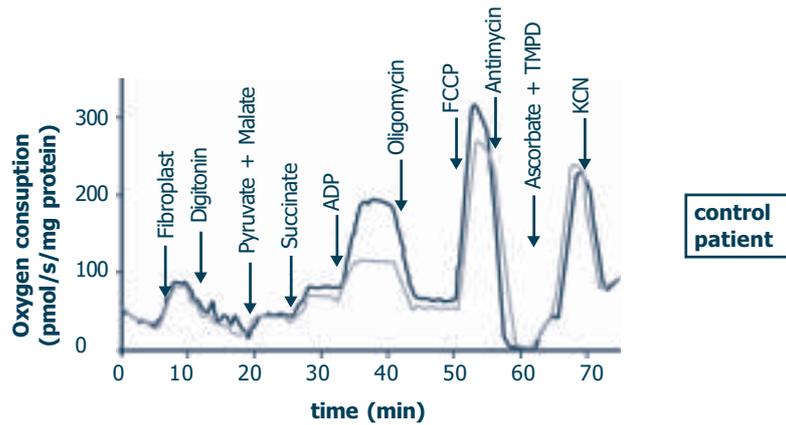


Fig. 5. Oxygen consumption by digitonised cultured skin fibroblasts, the endogenous respiration stimulated by pyruvate, malate, succinate and ADP in patient's fibroblasts was only 47% of control.

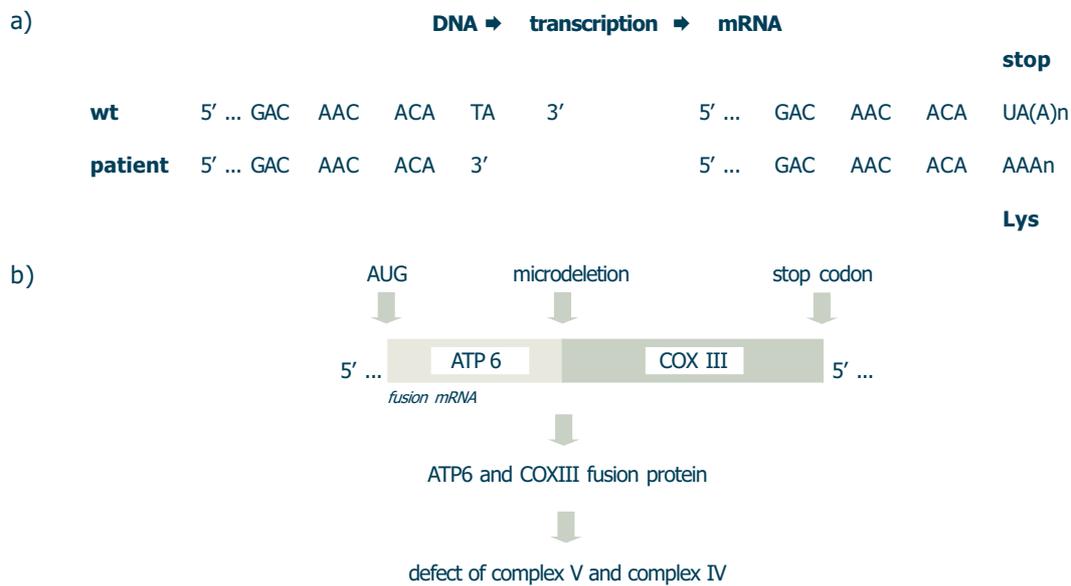


Fig. 6. The possible impacts of 9205delTA mutation on protein expression.

a) The mutation disrupts the translation termination

b) The mutation destroys the normal cleavage site of polycistronic precursor between ATP6 and COIII and leads to fusion mRNA creation.

TAB. 1. THE SPECTROPHOTOMETRICALLY MEASURED ACTIVITIES OF RESPIRATORY CHAIN COMPLEXES IN ISOLATED MUSCLE MITOCHONDRIA AND CULTURED SKIN FIBROBLASTS. RESIDUAL ACTIVITY IS PERCENTAGE OF THE LOW BORDER OF REFERENCE RANGE; (ND – NOT DONE)

Enzyme	Isolated muscle mitochondria			Fibroblast		
	Activity	Reference range	Residual activity	Activity	Reference range	Residual activity
	nmol min ⁻¹ mg of protein ⁻¹			nmol min ⁻¹ mg of protein ⁻¹		
COX	371	287–1077		2,4	18–40	13%
CS	284	200–640		42,52	45–70	94%
COX/CS	1,3	0,66–2,25		0,05	0,17–1,17	
SCCR	98	50–206		nd	nd	
NCCR	43	20–108		10,61	7–35	
QCCR	54	100–257	54%	14,1	7–30	
NQR	192	194–354	98%	33,78	15–50	

3. Místo

**PREVALENCE FAMILIÁRNÍHO
HYPERALDOSTERONISMU TYPU I. V ČESKÉ
REPUBLICI**

Autoři: David Zogala, A. Hořínek, Z. Lacinová, M. Hampf, R. Bernhardt, B. Štrauch, T. Zelinka, J. Widimský

Školitel: doc. MUDr. Jiří Widimský, CSc., III. interní klinika 1. LF a VFN Praha, MDC Berlin, Německo



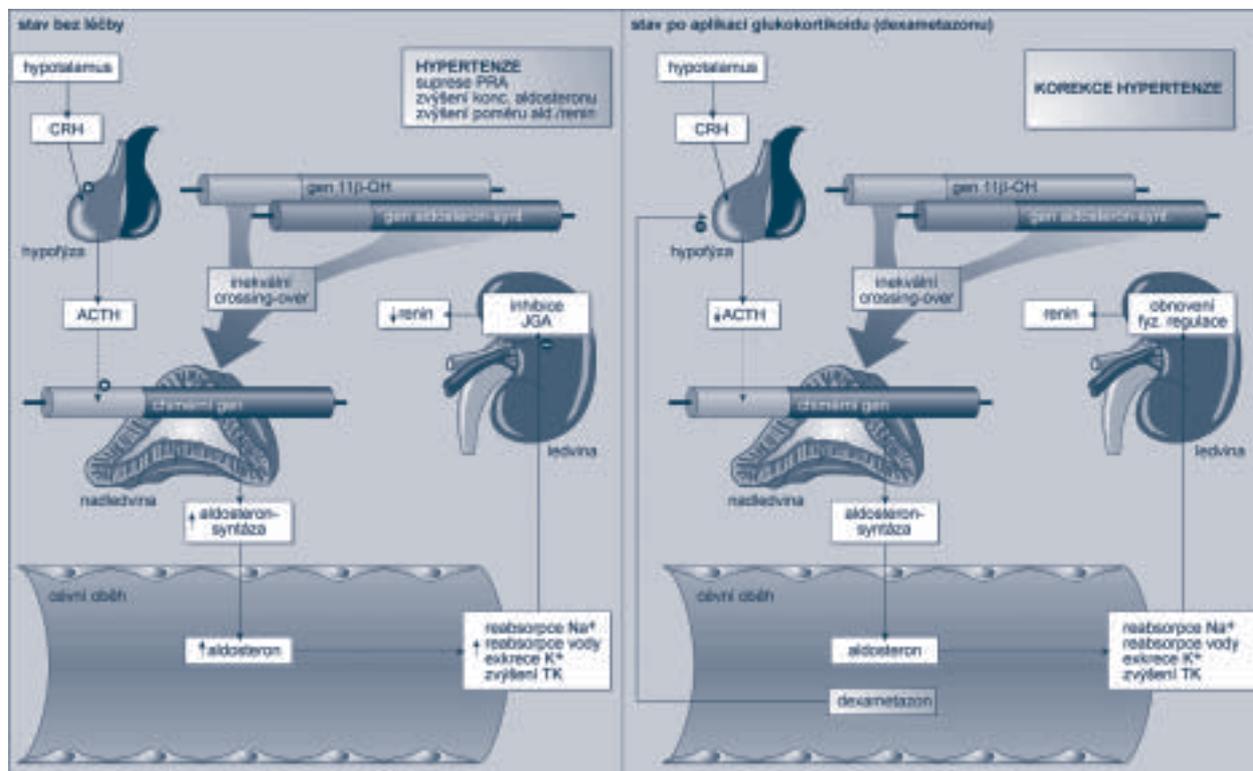
David Zogala

ÚVOD

Familiární hyperaldosteronismus typu I. (dále jen FH I.) je geneticky determinovaný podtyp primárního hyperaldosteronismu (dále jen PH), autozomálně dominantně dědičný, klinicky se projevující především jako hypertenze středního až těžkého stupně, která ustupuje po podání glukokortikoidů. Výskyt hyperaldosteronismu, jenž je potlačen po aplikaci glukokortikoidů, zachycují synonyma FH I.- dexametazonem supresibilní hyperaldosteronismus nebo Glucocorticoid-Remediable Aldosteronism v literatuře anglické. Tento syndrom byl poprvé popsán Sutherlandem et al. v roce 1966 jako hypokalemický hypertenzivní stav u 2 pacientů, otce a syna, a v počátcích byl v literatuře zachycován jako jednotka odpovídající klasickému popisu stavu s nadbytkem mineralokortikoidů, zahrnující hypertenzi, hyporeninémií a hypokalémií. Současné výsledky však ukazují, že takto plně je fenotyp vyjádřen jen u malé části pacientů.

Za fyziologických podmínek je v organismu sekrece aldosteronu regulována systémem renin-angiotensin: juxta-glomerulární aparát v ledvině reaguje na pokles TK, pokles natrémie, vzestup kalémie sekrecí reninu, který v konečném důsledku způsobí vzestup plazmatické koncentrace angiotenzinu II, jenž vedle přímých hypertenzivních účinků také stimuluje zona glomerulosa nadledviny k produkci aldosteronu. Konkrétně je stimulována exprese genu pro aldosteron-syntázu, která je konečným enzymem na cestě syntézy mineralokortikoidních hormonů. Aldosteron svými účinky na distální tubulus ledviny způsobuje reabsorpci sodného iontu výměnou za iont draselný a s tím spojenou osmotickou reabsorpci vody a zvětšení cirkulujícího plazmatického objemu, potažmo krevního tlaku.

Zcela jinou smyčkou je ve zdravém organismu regulována sekrece glukokortikoidů- při vystavení stresovým podmínkám (a také s diurnálním rytmem) stimuluje hypotalamus prostřednictvím CRH adenohipofýzu k sekreci ACTH. Ten ovlivňuje opět nadledvinu, v ní však gen pro 11b-hydroxylázu (CYP11B1), jež je enzymem syntézy glukokortikoidů. Její zvýšená exprese způsobuje zvýšení koncentrace kortizolu v plazmě. Kortizol má široké spekt-



Obr. 1 Patogeneze FH I.

rum účinků, zejména na metabolismus (hyperglykemizuje, mění distribuci tělesného tuku, má imunosupresivní účinky, atd.) a jeho zvýšená koncentrace v krvi zpětně inhibuje tvorbu ACTH v adenohypofýze.

Základním momentem v patogenezi FH I. je inekvální crossing-over a vznik chimerického genu z genů pro 11b-hydroxylázu (CYP11B1) a aldosteron-syntázu (CYP11B2) na 8. chromozomu. Kódující sekvence těchto dvou genů vykazují vysoký stupeň homologie (>90%). Chimerický gen je tvořen promotorem genu pro 11b-hydroxylázu (čili je ovlivňován ACTH) a kódujícími sekvencemi genu pro aldosteron-syntázu. Sekrece aldosteronu se tak dostává pod kontrolu ACTH, aldosteron je tvořen ve zvýšené míře a je utlumena fyziologická regulace přes RAAS. Po aplikaci exogenního glukokortikoidu se obnovuje zpětný inhibiční vliv na adenohypofýzu, klesá koncentrace ACTH, chimerický gen není stimulován k nadbytečné produkci aldosteron-syntázy (...aldosteronu) a navrácí se regulace sekrece aldosteronu přes RAAS. Patogenezi FH I. shrnuje obr. 1.

V klinickém obrazu FH I. dominuje hypertenze středního až vyššího stupně. Charakteristický je pro ni nástup v mladším věku, špatná ovlivnitelnost běžnou antihypertenzivní terapií a interindividuální variabilita v postižených rodokmenech. Dále je zjištělná zvýšená hladina aldosteronu v krvi, snížená plazmatická reninová aktivita a zvýšený poměr aldosteron-renin v plazmě. Bylo by logické očekávat u nemocných sníženou hladinu draselného iontu v krvi, ukazuje se však, že většina pacientů je normokalemických, mechanismus je neznámý. U pacientů s FH I. je dále pozorován zvýšený výskyt hemoragických mozkových cévních příhod v mladším věku, spojený s vysokou mortalitou (61%).

CÍL PRÁCE

Cílem studie bylo zavést metodu genetické diagnostiky FH I. na III. int.

klinice VFN a s její pomocí pak určit prevalenci FH I. na velkém souboru pacientů s potvrzeným primárním hyperaldosteronismem.

METODIKA

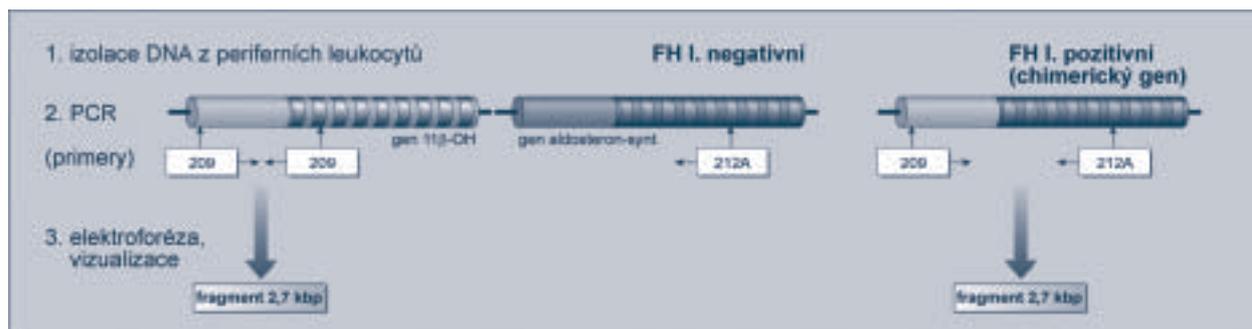
Výchozí soubor se skládal ze 422 pacientů (276 žen, 146 mužů, prům. věk 51 let) s hypertenzí středního až vyššího stupně. Základní charakteristiky vyšetřených pacientů zachycuje tab. 1. U těchto pacientů byla alespoň 14 dní před vyšetřením vysazena antihypertenzivní terapie a pak během krátké (3-5 denní) hospitalizace podstoupili blok diagnostických postupů. Prvním krokem studie bylo v tomto souboru odhalit pacienty s PH. K tomu bylo použito následujících metod (v závorkách jsou uvedeny hodnoty, jejichž dosažení bylo považováno za kritérium diagnózy PH):

1. měření plazmatické koncentrace aldosteronu ($PA \geq 150$ ng/l)- komerční RIA metoda
2. měření plazmatické reninové aktivity ($PRA \leq 0,7$ ng/ml/h)- komerční RIA metoda (obojí Immunotech, France)
3. výpočet poměru aldosteron-renin (aldosterone/renin ratio, $ARR \geq 50$ (ng/100ml)/(ng/ml/h))
4. diagnózu PH potvrzoval zátěžový test s infúzí solí (absence poklesu nebo pouze mírný pokles koncentrace aldosteronu po infúzi)- test byl prováděn ráno, po nejméně 8 hodinovém setrvání pacienta vleže.

U pacientů, u kterých byl takto zjištěn PH, byla pak po izolaci DNA z periferních leukocytů provedena genetická analýza formou jednoduché PCR (5), jejíž reakční směs obsahovala primer 210 (5´-AAACACAGGCCCTGACCCGTATCCC-3´, antisense), primer 212A (5´-GAGCGTCATCAGCAACCGAAACCCT-3´, antisense), primer 209 (5´-CCCATGACGTGATCCCTCTCGAAGG-3´, sense), 200 mmol každého nukleotidu, 200-400 ng DNA pacienta, 1,5 mmol MgCl₂, 50 mmol KCl, Tris (pH 9), 0,01% želatiny, 0,1% Triton X-100 a 2,5 jednotky Taq polymerázy (AmpliAq, Perkin-Elmer). Reakční program byl 35x94°C 1 min., 64°C 2 min. a 72°C na 5 min. Produkt PCR byl pak rozdělen elektroforézou a vizualizován po nabarvení etydiumbromidem pod UV světlem. U pacientů s chimerním genem produkují primery 209 a 212A specifický fragment o velikosti 4,4 kbp. U vzorků od zdravých jedinců je detekova-

TAB. 1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY PACIENTŮ S PH

parametr	průměr	SD
věk	51	11
syst. TK	167	22
diast. TK	103	11
plazm K+ (mmol/l)	3,51	0,55
plazm. aldosteron (ng/l)	422	369
PRA (ng/ml/h)	0,22	0,19
ARR ((ng/100 ml)/(ng/ml/h))	459	733
BMI (kg/m²)	29,2	5,4



Obr. 2 Genetická diagnostika FH I.

telný pouze fragment o velikosti 2,7 kbp, který se amplifikuje díky primeru 210, jenž tak slouží jako kontrola. PCR metodiku zachycuje schema na obr 2.

K odhalení jiných příčin PH a sekundární hypertenze byly použity obvyklé morfologické a laboratorní metody.

VÝSLEDKY

Pomocí výše uvedených kritérií byl PH určen celkem u 97 pacientů (23%). Nejčastější příčinou PH ve vyšetřované skupině byl idiopatický hyperaldosteronismus (41%) a aldosteron produkující adenom (36%). FH I. byl po provedení genetické analýzy určen u 3 pacientů (3% z PH, resp. 0,7% z výchozího souboru). Výsledky shrnuje graf na obr. 3.

obr. 3 Relativní zastoupení jednotlivých příčin PH ve vyšetřované skupině.

DISKUZE

Do současné doby nebyla dle našich vědomostí publikována data popisující výskyt FH I. v ČR. Výsledky je možno porovnat se studii provedenými v Chile (3) (design studie analogický naší, u 309 pacientů s „esenciální“ hypertenzí nalezen ve 29 případech PH, FH I. geneticky potvrzen u 2) a v Itálii (4) (ze 117 pacientů 60 pozitivně zareagovalo na dexametazonový supresivní test, gen. analýzou nebyl FH I. potvrzen u žádného pacienta). Jejich výsledky jsou konzistentní s našimi a naznačovaly by, že v prevalenci FH I. nejsou výrazné geografické rozdíly, k potvrzení této hypotézy by však bylo třeba porovnat výsledky z většího počtu regionů.

Naše studie zachytila poměrně vysoký výskyt PH v hypertenzní populaci (23%-obvykle se udává mezi 1-10%), tento fakt přičítáme jistě preselekcí pacientů zahrnutých do studie. Neselektivní hypertenzivní populaci lze však velmi obtížně definovat. PH se zdá být nejčastější příčinou endokrinně podmíněné hypertenze.

Genetická analýza genu pro FH I. je metodou, která je při správném provedení 100%-ně senzitivní a specifická. Oproti dexametazonovému supresivnímu testu (100% specifita, 92% senzitivita (6)) méně zatěžuje pacienta (pouze jeden odběr venózní krve) i personál. Pro DST také není zpracována jednotná metodika (krátké trvání testu způsobí vyšší záchyt falešně pozitivních výsledků a naopak trvání delší pak díky reaktivaci fyziologické regulace sekrece aldosteronu přes RAAS zvyšuje výskyt výsledků falešně negativních).

Výpočet poměru aldosteron-renin se při použití dostatečně vysoké cut-off hodnoty ukazuje jako vhodná screeningová metoda pro detekci PH ve skupině pacientů s hypertenzí. Hodnota $PAR \geq 50$ je pak spolehlivější než obvykle užívané hodnoty v rozmezí 20-30.

ZÁVĚR

Zdá se, že familiární hyperaldosteronismus I. Typu (FH I) je vzácnou formou mineralokortikoidní nadprodukce. Genetická analýza se ukazuje být vhodnou a vysoce citlivou metodou ke stanovení diagnózy FH I. a výpočet poměru aldosteron-renin v plazmě jako vhodná metoda ke screeningu PH.

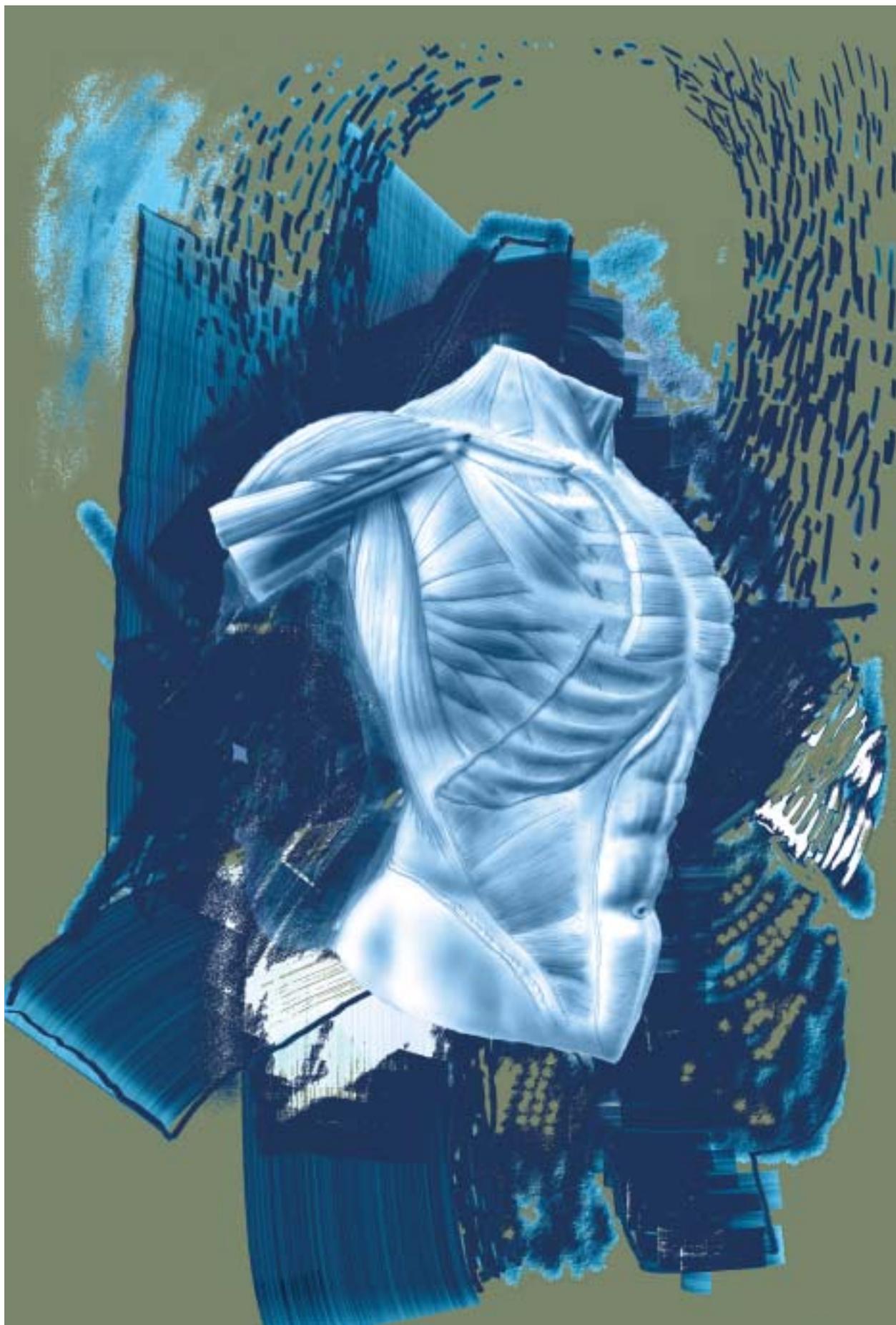
PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat všem, kteří se podíleli na této práci. Zejména pak školiteli doc. Widimskému za zkušené vedení a dr. Lacinové za čas strávený se mnou v laboratoři.

REFERENCE

1. Strauch B, Zelinka T, Hampf M, Bernhardt R, Widimsky J.: Prevalence of primary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region, *J Hum Hypertens.* 2003 May;17(5):349-52.

2. *Dluhy RG, Lifton RP: Glucocorticoid-remediable aldosteronism, J Clin Endocrinol Metab. 1999 Dec;84(12):4341-4. Review.*
3. *Fardella CE, Mosso L, Gomez-Sanchez C, Cortes P, Soto J, Gomez L, Pinto M, Huete A, Oestreicher E, Foradori A, Montero J.: Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology, J Clin Endocrinol Metab. 2000 May;85(5):1863-7.*
4. *Mulatero P, Veglio F, Pilon C, Rabbia F, Zocchi C, Limone P, Boscaro M, Sonino N, Fallo F.: Diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism in primary aldosteronism: aldosterone response to dexamethasone and long polymerase chain reaction for chimeric gene., J Clin Endocrinol Metab. 1998 Jul;83(7):2573-5.*
5. *Peters J et al.: Molekular-biologie, Klinik und Therapie steroidbedingter Hypertonien. In: Ganten D, Ruckpaul K (eds): Handbuch der Molekularen Medizin, Springer-Verlag: Berlin, 1998, str. 413-452*
6. *Litchfield WR, New MI, Coolidge C, Lifton RP, Dluhy RG.: Evaluation of the dexamethasone suppression test for the diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism., J Clin Endocrinol Metab. 1997 Nov;82(11):3570-3.*



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ - PŘEDNAŠKY

UMÍSTĚNÍ

1. MÍSTO

MUDr. Malík Radek, 4. r.

Školitel: prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Název práce:

„Dipeptidylpeptidáza IV a aktivitou a/nebo strukturou homologní molekuly (DASH) v neuroektodermových nádorových liniích.“

2. MÍSTO

MUDr. Hozík Tomáš, 3. r.

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.

Název práce:

„Carnitines profile during foetal and early postnatal period.“

3. MÍSTO

Mgr. Zídková Kateřina, 1.r.

Školitel: doc. MUDr. Richard Češka, CSc.

Název práce:

„Detekce variability v regulačních oblastech apolipoproteinu(a).“

1. místo

DIPEPTIDYL PEPTIDASE-IV ACTIVITY AND/OR STRUCTURE HOMOLOGUES (DASH) IN TRANSFORMED NEUROECTODERMAL CELLS

Autoři: ^{1,2}Radek Malík, ¹Petr Bušek, ¹Vladislav Mareš, ¹Jan Ševčík, ¹Zdeněk Kleibl and ¹Aleksi Šedo; ¹Laboratory of Cancer Cell Biology of the Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, 1st Faculty of Medicine of Charles University Prague and Institute of Physiology of Academy of Sciences of Czech Republic, U Nemocnice 5, Prague 2, 12853, Czech Republic; ²Department of Oncology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, U Nemocnice 2, 12808, Prague 2, Czech Republic

Školitel: prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF



Radek Malík

1. Introduction

Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5, CD26) was for many years believed to be a unique cell membrane protease cleaving X-Pro dipeptides from the N-terminal end of peptides and proteins. DPP-IV has been implicated in numerous physiological functions, although the precise underlying mechanisms await further clarification (Šedo and Malík, 2001).

Subsequently, a number of other molecules exhibiting DPP-IV-like enzyme activity, thus possibly sharing similar set of catalytic partners, was discovered. A term "DPP-IV activity and/or structure-homologues" (DASH) has been coined for the group comprising DPP-IV, Fibroblast activation protein-a, DPP6, 8, 9, Attractin, N-acetylated- α -linked-acidic dipeptidases I, II and L, Quiescent cell proline dipeptidase, Prolyl carboxypeptidase, Thymus-specific serine protease, DPP-IV- α etc. Furthermore, biological functions mediated by DASH independently on their hydrolytic potential (Šedo and Malík, 2001) likewise "on-demand" expression of enzymatically active or inactive form of DASH were suggested (Malík et al.2001, Tang et al.2000). Molecular complexity of DASH could explain some seeming contradictions of formerly hypothesized DPP-IV roles (Šedo and Malík, 2001). Functional studies of most of DASH are still lacking and particular biological functions of these molecules as yet remain mostly speculative rather than proven. However, the possible ability of DASH to complement and/or functionally substitute DPP-IV/CD26 – on the level of its enzymatic activity – implies that DASH may be involved in analogous processes like DPP-IV. Similar substrate specificity combined with differences in other enzymatic properties of particular DASH may be the reason why a subtle difference in their expression pattern might be of biological relevance.

The objective of our work is to analyse complexity of DPP-IV-like enzymatically active DASH molecules in transformed neuroectodermal cells.

2. Methods

Panel of neuroectodermal cell lines of different growth rate and degree of malignity was used (Tab.1). Cells were cultured under the standard conditions according to provider (ETCC) instructions. Proliferation

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE NEUROECTODERMAL CELL LINES STUDIED

Cell line	U87	U138	T98G	U373	Hs683	SK-MEL-1	SK-MEL-28	Hs294T
Origin*/grade	G/IV	G/IV	G/IV	G/III	G/I	M	M	M
Proliferation rate (S phase%)	18	23	31	20	25	n.d.	19	19
GFAP	+++	-	-	+++	-	n.d.	n.d.	n.d.

*G – glioma, M – melanoma; n.d. – not determined

rate was quantified in exponentially growing cells by DNA flow cytometry, expression of glial differentiation marker GFAP was determined by immunohistochemistry.

In experiments with quiescent cells, culture media were devoid of foetal calf serum.

Expression of particular DASH mRNA was assayed using reverse transcription PCR, the specificity of PCR products was confirmed by cyclic sequencing using the same PCR primers. Enzyme activities were measured by continuous fluorimetric assay. Further characterization of enzymatic and molecular properties of individual

DASH was performed by inhibition studies, subcellular localization, gel filtration and gradient polyacrylamide gel electrophoresis (GPAGE) with fluorescent contact print enzyme activity detection. Abovementioned methods were used as we described before (Malik et al. 2001).

3.Results

3.1. Expression of DASH mRNA

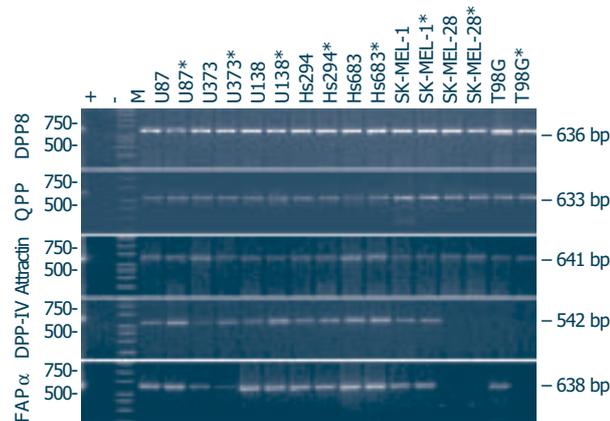


Figure 1. RT-PCR analysis of DASH expression in neuroectodermal cell lines in proliferating and *quiescent populations.

As shown in Fig.1, mRNA of DPP8, QPP, Attractin, DPP-IV and FAP-a is expressed in most cell lines studied, cultured both under standard or serum-deprived conditions ("proliferating" and "quiescent" cells respectively). Negative results were observed in case of DPP-IV/CD26 in SK-MEL-28 and T98G cells. Moreover, FAP-a was absent in SK-MEL-28 cells and downregulated by withdrawing of serum in T98G cells.

3.2. Characterization of DASH enzymatic and molecular properties

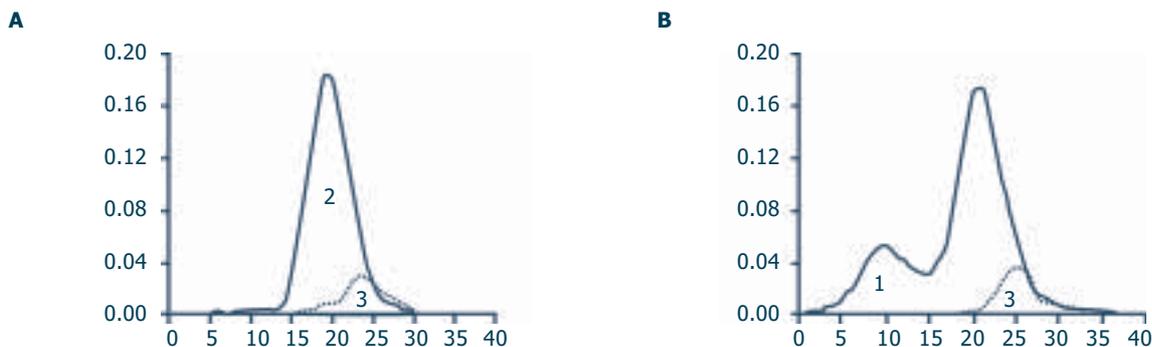


Figure 2. Distribution of DPP-IV-like activity from neuroectodermal cell lines after Sephacryl S-300 gel filtration. Vertical axes: relative DPP-IV-like enzyme activity measured with GP-NHMec as a substrate; horizontal axes: number of fraction. Solid line: pH 7.4, dashed line: pH 5.5. 669, 440, 140 (kDa) MW markers were eluted in fractions 7, 13, 25 respectively. Panel A: U373, T98G, SK-MEL-28, HS294T Panel B:U87, U138, Hs683

There are basically two patterns of DPP-IV-like enzyme activity after the gel chromatography separation of the cell line extracts. They comprise 2 or 3 peaks of Glycyl-Prolyl-7-amino-4-methycoumarin (G-P-NHMec) cleaving enzyme activity, differing in the molecular weight and pH preference. Two peaks (2 and 3 in Fig.2A) were found in U373, T98G, SK-MEL-28 and HS294T, whereas three peaks (1-3 in Fig.2B) in U87, U138 and Hs683 cells. Enzyme activity in fractions from peaks 1 and 3, in contrast with the ones from peak 2, was trypsin treatment resistant.

Inhibition studies (Tab.2) shown some preferences toward DPP-IV-like activity from peaks 1-3: Ala-Pyrr-CN 1>2>>3; Diprotin A: 1>2>>3; b-mercaptoethanol inhibits preferentially enzyme activity of peak 3, whereas

TABLE 2. IC₅₀ OF SELECTED INHIBITORS OF DPP-IV-LIKE ENZYME ACTIVITY IN PEAKS FROM GEL FILTRATION

Peak No	1	2	3
Ala-Pyrr-CN	0.01 mM	0.1 mM	> 10 mM
Arg(PMC)-Pyrr-CN	0.005 mM	0.05 mM	1 mM
Ile-Thia	0.5 mM	2 mM	> 20 mM
Ile-Pyr	0.5 mM	2 mM	> 20 mM
Diprotin-A	1 mM	5 mM	20 mM
Diprotin-B	5 mM	5 mM	> 30 mM
Bestatin	10 mM	> 50 mM	> 50 mM
b-mercaptoethanol	2%	1%	< 1%

Bestatin is a potent inhibitor of DPP-IV-like activity of peak 1, with almost no effect toward the enzyme activity from peaks 2 and 3. Moreover, DPP-IV-like activity of peak 1 was trypsin resistant (not shown). The efficiency of all inhibitors was very similar in all cell lines tested. Considering all these observations, we assume the DPP-IV-like enzyme activity might be, eventhough not exclusively, carried by Attractin in peak 1. Indeed, immunoreactivity of Attractin has been observed in peak 1 from U87 cells previously (Malik et al. 2001). Acidic

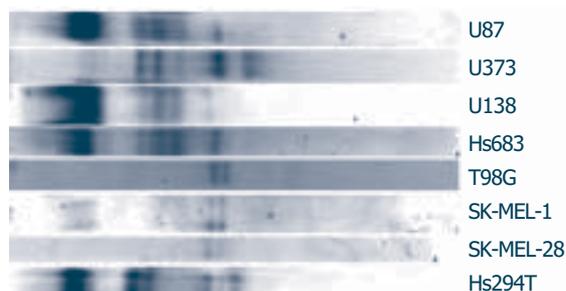


Figure 3. Non-denaturing GPAGE of DPP-IV-like enzyme activity from neuroectodermal cell lines.

pH optimum suggests presence of QPP in peak 3. Molecular species carrying DPP-IV-like enzyme activity in peak 2 could only be speculated.

Non-denaturing GPAGE argues for further cell line specific DASH heterogeneity. (Fig.3). This heterogeneity may be caused by presence of more DASH, differences in posttranslational processing, existence of more splice variants of particular DASH as well as by the presence of naturally existing heterodimers (Scanlan et al. 1994) or artificial complexes of some DASH molecules. However, absence of slowly migrating bands observed in GPAGE combined with no detectable levels of DPP-IV and FAP? mRNA (Fig.1) in material from T98G and SK-MEL-28 cells should be noticed.

Taken together, decisive identification of cell line specific patterns of DPP-IV-like enzyme activity bearing molecules of different MW is still not possible.

3.3.DASH enzyme activities in quiescent cells

To study the modifying effect of cell growth rate on the specific DASH expression pattern, DPP-IV-like enzyme activities were evaluated in quiescent cells deprived of growth factors by withdrawal of serum from culture medium. The effect was monitored within 6 to 72 hours period. This treatment caused different results in the individual cell lines.

In glioma IV grade U87 and U138 cells, the enzyme activity attributable to Attractin increased three times, whereas the remaining two DPP-IV-like activity fractions remained unchanged. On the contrary, about double elevation of the hypothetical QPP, together with a similar increase in Attractin activity, was observed in glioma I grade Hs683 cells. Double rise of QPP was found also in Attractin negative T98G glioma IV grade cells. Slight elevation of QPP activity was also observed in melanoma cell lines SK-MEL-28 and Hs294T. All these changes were time dependent.

4. Concluding remarks

Final matching of the particular DPP-IV-like enzyme activity with individual DASH molecule in the panel of cell lines used in this study still remains partially speculative. However, our data suggests the following conclusions:

(i) DASH expression pattern and its changes during transition of cells from the proliferation to the quiescent stage of growth probably depend on cell type. Its functional impact may finally depend on the availability of catalytic partners in the vicinity of the particular cell.

(ii) Change of DASH formula, seemingly hidden behind the whole DPP-IV-like hydrolytic activity, may shift particular substrate preference, resulting in modified response of the cell to the signals carried by biologically active DASH substrates. It may therefore be not only the inappropriate production of a regulatory molecule, but also the disordered regulation of its processing system which could be of pathogenetic relevance. Together, we assume that DASH molecules may represent an important phenotypic feature related to the actual cell growth properties. Such conclusion is indirectly supported also by our preliminary studies of DASH downregulation by RNAi (Elbashir et al. 2002). Inhibition of cell proliferation and decreased survival was observed in cells exposed to Attractin-specific siRNAs, whereas downregulation directed to other DASH (DPP-IV, 8, 9, FAP?, QPP) have only slight effect on cell growth (unpublished results).

(iii) Inhibitors of DPP-IV-like enzymatic activity are expected to be of a significant therapeutic value in the treatment of HIV infection, diabetes mellitus and as immunosuppressants in the transplantation surgery and autoimmune diseases, including multiple sclerosis (Augustyns et al. 1999). Due to an almost ubiquitous expression and multifunctional nature of the majority of DASH, it may be difficult to predict the final physiological consequences of inhibition of a particular DASH in different organ systems. Hence, the prerequisite for exploiting DASH as the pharmacological targets is understanding the subtle differences in their enzymatic activity parameters, "specificity" derived from their organ/tissue dependent expression patterns and their dynamics, which are at least in some cases determined by the functional status of the cell (Šedo and Malík 2001). Despite of these objections, modulation of DASH enzyme activity may be an attractive therapeutic option in the future.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants 301/02/0962 and 7/2002/C from Grant Agency of Czech Republic and Grant Agency of Charles University respectively and the research project "Oncology" of the 1st Faculty of Medicine of Charles University. Skilful technical help of Mrs Květoslava Vlašicová and Karin Roubíčková is greatly appreciated.

6. References

1. Augustyns, K., Bal, G., Thonus, G., Belyaev, A., Zhang, X.M., Bollaert, W., Lambeir, A.M., Durinx, C., Goossens, F., Haemers, A., 1999, *The unique properties of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26) and the therapeutic potential of DPP IV inhibitors*. *Curr. Med. Chem.*, **6**:311-27.
2. Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., Tuschl, T., 2002, *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs*. *Methods*, **26**:199-213.
3. Malík, R., Mareš, V., Kleibl, Z., Pohlreich, P., Vlašicová, K., Šedo, A., 2001, *Expression of attractin and its differential enzyme activity in glioma cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**:289-94.
4. Scanlan, M.J., Raj, B.K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M.P., Healey, J.H., Old, L.J., Rettig, W.J., 1994, *Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **9**:5657-61.
5. Šedo, A., Malík, R., 2001, *Dipeptidyl peptidase IV – like molecules: homologous proteins or homologous activities?* *Biochim. Biophys. Acta*, **1550**:107-116.
6. Tang, W., Gunn, T.M., McLaughlin, D.F., Barsh, G.S., Schlossman, S.F., Duke-Cohan, J.S., 2000, *Secreted and membrane attractin result from alternative splicing of the human ATRN gene*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:6025-6030.

2. místo

CARNITINE PROFILE DURING FOETAL AND EARLY POSTNATAL PERIOD

Autoři: T. Honzik, P. Chrastina, H. Hansikova, M. Elleder and J. Zeman

Školitel: prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc., Department of Paediatrics and Neonatology and Institute of Inherited Metabolic Disorders, Faculty of Medicine, Prague.



Tomáš Honzik

INTRODUCTION

In neonates, the postnatal adaptation to extrauterine life depends critically on the rapid switch in metabolic pathways relevant to energy provision from foetal anaerobic glycolysis to the neonatal oxidative phosphorylation. Premature neonates are the major contributors to neonatal morbidity. Most diseases are secondary to immaturity of organ systems. The lower availability of free carnitine, lower carnitine tissue stores and potential restriction of fatty acid oxidation capacity may be connected with worse postnatal adaptation.

L-Carnitine is ubiquitous in mammalian tissues and is derived mainly from exogenous sources (75%) and in part from endogenous synthesis. Two aminoacids lysin and methionin are crucial in carnitine synthetic pathway. The main source of carnitine in the fetus seems to be transplacental transfer and in the newborn seems to be breast milk or carnitine-supplemented formulas. Endogenous syntesis plays a minor role in early life because the activity of g-butyrobetaine hydroxylase is very low. 98% of carnitine is localised in muscle and in tissues. In blood carnitine constitutes only 2% of carnitine stores. Carnitine in blood is 20-60 times less concentrated than in tissue.

The aim of our study was 1) analyse the concentrations of free carnitine (FC), total carnitine (TC) and acylcarnitines (AC) in preterm and full term neonates in cord blood and during the first days of life. 2) compare two methods for carnitine measurement, electrospray-tandem mass spectrometry and radioenzymatic method and 3) study the effect of enteral and parenteral nutrition to carnitine concentrations in premature neonates and term newborns.

MATERIAL AND METHODS

Patients and blood specimen collection: Two group of neonates were studied 35 healthy term AGA (appropriate-for-gestational-age) neonates (16 boys and 19 girls, birth weight $3485 \pm 309\text{g}$) and 28 premature neonates, AGA (12 boys and 16 girls, birth weight $1855 \pm 765\text{ g}$, range 590-2620g, gestational age 222 ± 42 days (23-37 wk). Blood samples from the umbilical vein were taken immediately after birth collected and transferred into the tubes containing natrium citrate. Two drops of blood were than spotted on a Guthrie card and the odd blood was rapidly centrifugated and fresh plasma was immediately frozen at -70°C until assay. A second blood sample was obtained on the postnatal day 4-6 in term neonates and 7-9 in premature neonates by heel-stick puncture during routine neonatal metabolic screening. In premature neonates enteral feeding was started during the first day of life with expressed breast milk or a preterm milk formula. Enteral feeding was increased daily as tolerated. Additional parenteral nutrition without carnitine supplementation was carried out untill full enteral feeding was established.

Sample preparation and measurement.All dried blood spots were investigated by means of electrospray-tandem mass spectrometry. One 3-mm diameter dot per sample was punched out from a 10- mm diameter dried blood spot into a vial of a 96-well microtiter plate. The samples were eluted in 200 ul of the methanol stock solution containing deuterium labelled (marked, stamped) standarts of aminoacids and acylcarnitines for 25 minutes. They were evaporated to dryness and then 100 ul 3 N HCl in butanol were added. The microtiter plates were sealed and incubated at 60°C in a forced air oven for 30 minutes. After removal of the seal, excess HCl-butanol was evaporated to dryness. The derived samples were reconstituted with 100 ul acetonitril/water (1:1), containing 0,02% formic acid analysed in ESI-MS/MS. Acylcarnitine concentrations were summarized to obtain levels for short (C2-5), medium (C6-12) and long-chain acylcarnitines (more than C12). Short, medium and long chain acylcarnitines were again summarized to yield total acylcarnitine concentrations.

Plazma carnitine levels were assayed by a radioenzymatic techniques of McGarry and Foster in 1976, Di Donato et al 1984 (9). The fraction of ACs was determined by subtraction of FC from the amount of TC which is assessed after alkaline hydrolysis of all carnitine esters. A method is based on the conversion of carnitine into [^{14}C] acetylcarnitine by carnitine acetyltransferase (CAT) using [^{14}C] acetyl-CoA as a substrat. Radiolabeled product acetylcarnitine is separated from the substrate by ion exclusion chromatography with an anion exchange resin. The labeled substrate is retained by the resin, whereas the radiolabeled product acetylcarnitine is excluded from the anion-exchanger and remains in the eluent. The eluate is collected into a scintillation vial, than scintillation fluid is added, mixed and counted.

Ethics: The study was approved by the Medical Ethics Committees of all the collaborating institutions. Informed consent was obtained from the parents.

Statistical Analysis: The program STATISTICA version 4.5 was used for statistical analyses. Cord blood samples of the term and premature neonates were compared with the samples taken on postnatal day 7-9 or 5 respectively and tested with T test for paired samples. The Student's test for unpaired samples was used to test for differences between the individual groups. Simple linear regression was used to test for the interaction between carnitine concentrations and gestational age or birth weight. Differences were regarded statistically significant at a p-level < 0.05.

RESULTS

Concentrations of carnitine evaluated by radioenzymatic method in plasma obtained from cord blood in full-term and premature neonates were lower in comparison with levels obtained by MS/MS method.

Plasma level of FC, AC and TC in cord blood estimated by radioenzymatic method were significantly higher in premature neonates in comparison with term neonates. On the contrary, the total blood pool of FC and TC in cord blood evaluated by MS/MS method were significantly lower in premature neonates in comparison with term neonates (Fig. 1)

In all neonates positive correlation was observed between free carnitine level in cord blood estimated by MS/MS method and birth weight and gestational age (Fig.2)

In both groups of neonates the blood level of TC decreased significantly during the first 4-6 days of life in term neonates and during 7-9 days after birth in preterm neonates in comparison with levels in cord blood (Tab.1). During the same period the blood concentration of FC decreased in term newborns and blood level of AC decreased in premature neonates resulting in similar AC/FC ratio in premature and term neonates.

In both groups of neonates the blood level of short chain acylcarnitines decreased and the blood level of medium chain acylcarnitines increased 4-6 and 7-9 days after birth, respective (Tab. 1). No significant changes were found in the level of long chain acylcarnitines.

In premature neonates in cord blood the ratio FC/TC was below 0,7 and ratio AC/FC above 0,4 as a marker of carnitine deficiency and insufficiency, respective. These values normalised during first week of life. Nevertheless the concentration of free carnitine was not below 20 $\mu\text{mol/l}$ as other sign of decrease carnitine reserves.

In premature neonates in the age of 7-9 days no correlation was found between levels of carnitine in blood and the amount of maternal milk or preterm milk formula intake in comparison with premature newborns without carnitine supplementation. The average concentrations of FC, TC and AC in mother's milk were 47,4 mmol/l , 71,65 mmol/l and 24,3 mmol/l , respective. We observed no change of carnitine content in human milk after pasterisation and in fresh and defrosted milk.

CONCLUSION

The MS/MS method is more appropriate for carnitine measurement and enables to gain more information about carnitine stores than measurement of plasmatic pool by radioenzymatic method.

Higher concentration of carnitine in premature neonates than in term newborns probably result from higher maternal carnitine concentration and higher placental transfer during earlier stage of gestation.

We found significant positive correlation between FC and gestational age and birth weight and negative correlation between AC and gestational age and birth weight using MS/MS method. These findings promote thesis of increasing carnitine stores and increasing enzymes activity that participate of fatty acid metabolism.

In both groups the concentration of TC significantly decreased during the first week of life. This is probably caused by decreasing carnitine reserves during the period of inappropriate intake of exogenous carnitine. In premature neonates during the first week of life, no correlation was found between levels of carnitine and the amount of maternal milk intake.

LITERATURE

1. Chace DH et al.: Neonatal blood carnitine concentrations: Normative data by electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res* 2003; 53: 823-829.
2. Wenchich L. et al.: Mitochondrial energy metabolism in very premature neonates. *Biol Neonate* 2002; 81: 229-235.
3. Hardy DT et al.: Determination of plasma free carnitine by electrospray tandem mass spectrometry, *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 665-670.
4. Meyburg J, Schulze A et al.: Postnatal Changes in Neonatal Acylcarnitine Profile, *Pediatr Res* 2001; 49: 125-129.
5. Akisu M, Bekler C et al.: Free carnitine concentrations in cord blood in preterm and full-term infants with intrauterine growth retardation, *Pediatrics International* 2001; 43: 107-108
6. Meyburg J, Schulze A et al.: Acylcarnitine profiles of preterm infants over the first four weeks of life, *Pediatr Res* 2002; 52: 720-723.

7. Ferrari R et al.: *L-Carnitine and its role in medicine: From function to therapy*. Academic press, monography, 1992
8. Novak M, Wieser PB et al.: *Acetylcarnitine and free carnitine in body fluids before and after birth*, *Pediatr Res* 1979; 13 (1): 10-5.
9. Nakano C, Tasashima S et al.: *Carnitine concentration during the development of human tissues*, *Early Hum Dev* 1989;19(1): 21-7.
10. Penn D, Ludwigs B et al.: *Effect of nutrition on tissue carnitine concentrations in infants of different gestational ages*, *Biol Neonate* 1985; 47(3): 130-5.
11. Campoy C, Bayes R et al.: *Evaluation of carnitine nutritional status in fullterm newborn infants*, *Early Hum Dev* 1998; 53: 149-164.
12. Bonner CM, Karan MD et al.: *Effects of parenteral L-carnitine supplementation on fat metabolism and nutrition in premature neonates*, *J Pediatr* 1995; 126: 287-92.

Acknowledgments

This work was supported by grants: IGA: NE 6555-3, GA UK 1/2002/C and VZ 64165

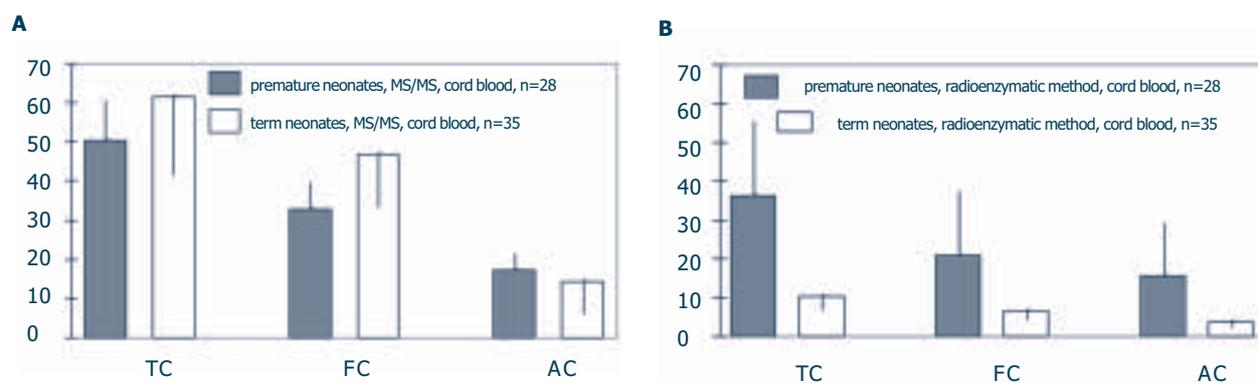


Fig. 1: A: Concentration of carnitines in cord blood estimated by MS/MS method. **B:** Plasma level of carnitines from cord blood estimated by radioenzymatic method.

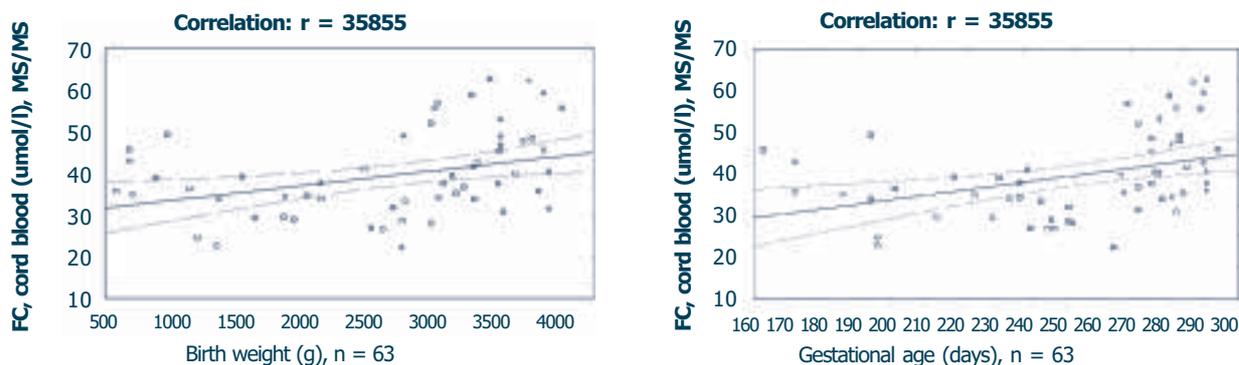


Fig 2: Concentration of free carnitine (FC) in cord blood measured by MS/MS method with increasing gestational age and birth weight.

TABLE 1: SUMMARY OF CARNITINE VALUES (MMOL/L ± SD) IN CORD BLOOD AND WHOLE BLOOD OBTAINED DURING THE FIRST WEEK OF LIFE ANALYSED BY MS/MS IN INFANTS OF VARIOUS GESTATIONAL AGE.

Group	A	B	C	D	P-values			
	Gestational age (wk) (n)	38-42 35	24-37 28	38-42 35	24-37 28			
Age (days)	Cord blood		4-5	7-9	A:B	C:D	A:C	B:D
	umol/l							
TC (total carnitines)	61,36 ± 20,3	50,3 ± 10	49,74 ± 14,47	43,05 ± 13,67	<0,01	NS	<0,005	<0,05
FC (free carnitines)	46,87 ± 13,9	32,9 ± 6,7	35,55 ± 11,03	31,51 ± 12,57	<0,001	NS	<0,0001	NS
tAC (acylcarnitines)	14,49 ± 8,7	17,4 ± 3,9	14,19 ± 5,1	11,53 ± 2,1	NS	<0,01	NS	<0,001
tAC/FC ratio	0,31 ± 0,13	0,53 ± 0,07	0,41 ± 0,13	0,4 ± 0,11	<0,001	NS	<0,0005	<0,001
FC/TC ratio	0,77 ± 0,07	0,65 ± 0,03	0,71 ± 0,06	0,73 ± 0,05	<0,001	NS	<0,001	<0,001
C2-5 (short chain acylcarnitines)	11,4 ± 7,9	13,9 ± 3,8	7,49 ± 3,93	6,48 ± 1,78	NS	NS	<0,02	<0,001
C6-C12 (medium chain acylcarnitines)	1,27 ± 0,25	1,35 ± 0,36	2,37 ± 0,78	2,15 ± 0,56	NS	NS	<0,002	<0,001
C12 (long chain acylcarnitines)	2,2 ± 0,76	2,16 ± 0,75	4,42 ± 2,8	2,56 ± 1,07	NS	<0,005	NS	NS
Carnitine esters with saturated chain	13,78 ± 8,3	16,7 ± 3,8	13,11 ± 4,96	10,56 ± 1,98	NS	<0,02	NS	<0,001
Carnitine esters with monounsaturated chain	0,72 ± 0,49	0,56 ± 0,14	1,08 ± 0,52	0,9 ± 0,3	NS	NS	<0,005	<0,001

3. Místo

DETEKCE VARIABILITY V REGULAČNÍCH OBLASTECH GENU PRO APO(A)

Autor: Mgr. Kateřina Zídková

Školitel: doc. MUDr. R. Češka CSc., III. interní klinika VFN a 1.LF



Mgr. Kateřina Zídková

Souhrn

Aterosklerotická onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí v moderní společnosti. Jedná se o multifaktoriální onemocnění s vlivem celé řady exogenních a endogenních faktorů. Jedním z nejvýznamnějších endogenních rizikových faktorů se ukázala být zvýšená hladina lipoproteinu(a) [Lp(a)], jehož fyziologická funkce nebyla doposud objasněna. Koncentrace lipoproteinu(a) je téměř pod výhradní kontrolou jediného lokusu, kterým je gen kódující apolipoprotein(a) [apo(a)]. Snahou tohoto projektu je odhalit míru variability v regulačních oblastech jmenovaného genu. Existence relativně častých mikrovariant v regulačních oblastech apo(a) genu a jejich odlišná kombinace u různých jedinců by mohla do značné míry vysvětlovat rozsáhlou variabilitu v hladině apo(a), respektive Lp(a), mezi jedinci.

Úvod

Navzdory velké řadě faktorů podílejících se na rozvoji aterosklerotických onemocnění lze za nejčastější příčinu jejich vzniku považovat poruchy v transportu a metabolismu lipidů. Lipidy jsou transportovány krevním řečištěm pomocí lipoproteinových částic. Rozlišujeme pět základních lipoproteinů (chylomikrony, VLDL, IDL, LDL, HDL), které se liší typem a množstvím obsažených lipidů a proteinovou složkou. Netypickým lipoproteinem je lipoprotein(a) [Lp(a)], jehož fyziologická funkce nebyla doposud objasněna. Lp(a) se skládá z LDL částice, která je prostřednictvím proteinu, apolipoproteinB-100, kovalentně vázaná na další protein, apolipoprotein(a) [apo(a)]. Apo(a) je zodpovědný za strukturní a funkční specifitu Lp(a) částice. Řada prospektivních a retrospektivních studií prokázala, že zvýšená hladina Lp(a) je u svých nositelů významně spojena s vyšší incidencí předčasných infarktů (3)(4).

Na rozdíl od základních lipoproteinů je hladina Lp(a) jen nepatrně ovlivněna endogenními a exogenními faktory a jeví vysoký koeficient dědivosti ($h > 0.9$)(1). Tato vysoká genetická determinovanost znaku je překvapivě téměř zcela (>90 %) vázaná na jediný lokus, kterým je gen pro apo(a)(2). Vzhledem ke skutečnosti, že jedinci s odlišnými hladinami Lp(a) jeví stejný podíl katabolizovaných částic musí být rozdíly v hladině tohoto lipoproteinu dány na úrovni syntézy a nikoliv degradace (7). Limitním krokem pro syntézu Lp(a) je dostupnost apo(a), tedy jeho koncentrace, pro vazbu s LDL částicí. Součástí genu pro apo(a) je rozsáhlá tandemová repetice kringlových domén o variabilním počtu (3-43). Odlišné hladiny apo(a) mezi jedinci v populaci jsou tak ze 40-60% (v závislosti na populaci) vysvětlovány délkovým polymorfizmem genu. Zbývající rozdíly mohou být vysvětleny jak odlišnou stabilitou mRNA, tak především rozdílnou efektivitou exprese tohoto genu u, v daném ohledu, odlišných alel. Právě výzkumem regulačních oblastí genu pro apo(a) se zabývá i řada současných studií (5)(6)(9)(10).

Podrobnější analýze byla podrobena především oblast promotoru. V proximálním promotoru se nalézají nezbytné transkripční elementy a elementy zodpovědné za specifickou expresi genu v jaterní tkáni. Polymorfismus +93C@T vytváří alternativní startovní kodon a mění tak expresi genu na úrovni translace. Žádný další z doposud nalezených polymorfizmů z této oblasti nejevil charakteristickou souvislost s hladinou Lp(a). V distální části promotoru se nachází pentanukleotidový mikrosatelit (TTT₅₋₁₁A). Některé studie poukazují na korelaci mezi určitou délkovou variantou tohoto lokusu a hladinou Lp(a) v krvi (8). To může být způsobeno vazbou na funkčně významný a dosud neobjevený polymorfismus.

Kromě výše zmíněné esenciální promotorové oblasti byla objevena další dvě regulační místa ve vzdálenosti 20 a 28 kb od genu, které mají charakter zesilovače. Ke specifické aktivaci těchto zesilovačů v jaterní tkáni dochází pravděpodobně na úrovni konformačních změn ve vyšších stupních chromatinu. Zesilovač ve vzdálenosti 20 kb od genu je současně promotorovou oblastí inaktivního L1 retrotranspozónu. Populační studie testující míru variability ve zmíněných zesilovačích zatím nebyly publikovány.

Výše uvedené skutečnosti stály za rozhodnutím otestovat míru variability v regulačních oblastech genu pro apo(a) na náhodném souboru jedinců. Nejprve bude analyzována oblast zesilovače ve vzdálenosti 28 kb od genu, do budoucna i ve vzdálenosti 20 kb od genu, dále bude hledána variabilita v proximálním promotoru a pro úplný obraz o míře variability v regulačních oblastech zmíněného genu bude současně provedena i genotypizace mikrosatelitu v distální části promotoru.

Materiál a metody

Soubor jedinců pro analýzu je náhodně vybraný z DNA banky lipidologické laboratoře III.interní kliniky, 1.LF a VFN UK.

Pro analýzu regulačních oblastí apo(a) genu bude užito molekulárně genetických metod: polymerázová řetězová reakce (PCR), denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), restriční analýza (RFLP) a fragmentační analýza.

Po nalezení variability bude nová varianta potvrzena sekvenací (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) a pomocí databáze vazebných míst učiněn předběžný odhad jejího funkčního významu (<http://transfac.gbf.de/programs.html>). V případě potřeby bude rovněž proveden výpočet vazebné nerovnováhy.

Sekvence byly získány pomocí NCBI databáze. Primery byly navrženy pomocí programu Primer3, restriční enzym byl nalezen pomocí programu NEBcutter V1.0. Zmíněné programy jsou volně přístupné na internetových stránkách.

Rozložení teplotních domén u fragmentů určených pro DGGE analýzu bylo provedeno pomocí programu WinMelt distribuovaného firmou Bio-Rad. Určení optimálního gradientového rozpětí pomocí perpendikulární denaturační gradientové gelové elektroforézy bylo provedeno na přístroji DCode™ od firmy Bio-Rad.

Výsledky

Před vlastní DNA analýzou bylo nutné provést řadu přípravných kroků. Na základě informací z literatury bylo nalezeno umístění zesilovače a pomocí NCBI databáze získána jeho sekvence (gi:2625011). Obdobně se postupovalo i u promotorové oblasti (gi:2323518). Fragmenty určené k DGGE analýze byly *in silico* otestovány na rozložení teplotních domén a na základě tohoto výsledku byly provedeny potřebné úpravy, především přidány GC klempy. Navázáním GC klempu k jednomu, druhému nebo k oběma primerům se vytváří umělá doména s nejvyšší teplotou tání (obr.B), která umožňuje úspěšnou detekci neznámých variant po celé délce analyzovaného fragmentu. Pomocí příslušného programu byly navrženy primery pro amplifikaci vybraných úseků. Délka ampliconu u promotorové oblasti je 346 bp a u zesilovače 266 bp (obr.A). K určení vhodného denaturačního gradientu byla použita speciální varianta DGGE analýzy tzv. perpendikulární denaturační gradientová gelová elektroforéza s gradientem od 0-100% (obr.C). Pro detekci známého polymorfismu +93C>T nacházejícího se v proximálním promotoru byl nalezen restriční enzym, který po naštěpení promotorového fragmentu 346 bp vytváří fragmenty o délce 57 a 291 bp. Délka ampliconu určeného pro fragmentační analýzu je od 154 bp(5 repetice) – 184 bp (11 repetice) v závislosti na délce mikrosatelitového lokusu.

Pro oba fragmenty v nichž budou hledány neznámé varianty o neznámé frekvenci byly navrženy mutační primery, které do příslušného fragmentu uměle zanášejí změnu. Tato změna je navržena tak, aby se nalezala v doméně o nejvyšší teplotě tání u původního (neklempovaného) fragmentu a tím pokrývá oblast s teoreticky nejobtížnějším zachytem variability (obr.B). Fragmenty s takto uměle vloženou variabilitou poslouží ke konečnému potvrzení správnosti vybraných podmínek a současně budou fungovat jako pozitivní kontroly při vlastní DNA analýze.

Diskuze

Stanovením podmínek pro analýzu regulačních oblastí genu pro apo(a) byl učiněn nezbytný a časově náročný krok nutný ke zmapování míry variability ve zmíněných oblastech. Oblast proximálního promotoru a oblast zesilovače ve vzdálenosti 28 kb od vlastního genu bude podrobena hledání neznámých variant s možným funkčním významem. V proximálním promotoru bude současně detekován již popsaný polymorfismus +93C>T, který mění efektivitu exprese genu na úrovni translace. V distálním promotoru bude provedena genotypizace délkových variant přítomného mikrosatelitu za pomoci fragmentační analýzy. Nyní nezbývá než provést tyto analýzy na vybraném souboru jedinců a zpracovat získané informace.

Variabilita o významné frekvenci v regulačních oblastech apo(a) genu by podporovala hypotézu, že rozsáhlý rozptyl v hladině Lp(a) je u různých jedinců do značné míry určován odlišnou efektivitou transkripce apo(a) genu. V případě odhalení takovéhoto potenciálně významných polymorfizmů se do budoucna počítá s otestováním jejich vlivu na míru transkripce za účelem vybrání funkčních variant. Varianty regulačních oblastí či jejich kombinace zvyšující expresi apo(a) genu by měly u svých nositelů zvyšovat riziko předčasných infarktů. Jejich znalost by tak umožňovala presymptomaticky určit jedince se zvýšeným rizikem rozvoje aterosklerotických onemocnění.

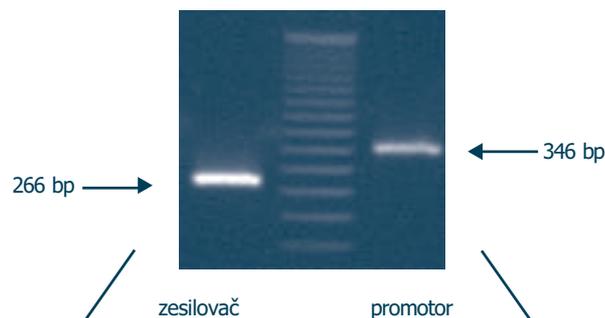
Citace

1. **Austin M.A., Sandholzer Ch., selby J.V., Newman B., Krauss R.M., Utermann G. (1992):** Lipoprotein(a) in Woman Twins: Heritability and Relationship to Apolipoprotein(a) Phenotypes: *Am J Hum Genet*, 51:829-840
2. **Boerwinkle E., Leffert C.C., Lin J., Lackner C., Chiesa G., Hobbs H.H. (1992):** Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations: *J Clin Invest*, 90:52-60
3. **Evans R.W., Shpilberg O., Shaten B.J., Ali S., Kamboh M.I., Kuller L.H. (2001):** Prospective association of lipoprotein(a) concentrations and apo(a) size with coronary heart disease among men in the Multiple Risk Factor Intervention Trial: *J Clin Epidemiol*, 54,51-57
4. **Paultre F., Tuck C.H., Boden-Albala B., Kargman D.E., Todd E., Jones J., Paik M.C., Sacco R.L., Berglund L. (2002):** Relation of apo(a) size to carotid atherosclerosis in an elderly multiethnic population: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22,141-146
5. **Puckey L.H., Knight B.L. (2002):** Interaction of oestrogen and peroxisome proliferator-activated receptors with apolipoprotein(a) gene enhancers: *Biochem J*, 366,157-163
6. **Puckey L.H., Knight B.L. (2003):** Sequence and functional changes in a putative enhancer region upstream of the apolipoprotein(a) gene: *Atherosclerosis*, 166(1):119-127

7. **Rader D.J., Cain W., Ikewaki K., Talley G., Zech L.A., Usher D., Brewer H.B., Jr. (1994):** The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate: *J Clin Invest*, 93:2758-2763
8. **Trommsdorf M., Köchl S., Lingenhel A., Kronenberg F., Delport R., Vermaak H., Lemming L., Klausen I.Ch., Faergeman O., Utermann G., Kraft H.-G. (1995):** A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentration in Caucasians: *J Clin Invest*, 96:150-157
9. **Wade D.P., Puckey L.H., Knight B.L., Acquati F., Mihalich A., Taramelli R. (1997):** Characterization of multiple enhancer regions upstream of the apolipoprotein(a) gene: *J Biol Chem*, 272(48):30387-30399
10. **Yang Z., Boffelli D., Boonmark N., Schwartz K., Lawn R. (1998):** Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element: *J Biol Chem*, 273(2),891-897

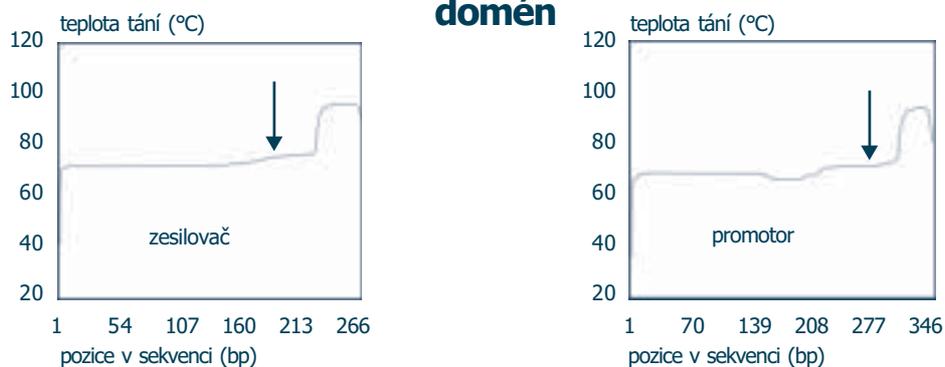
A)

Produkty PCR



B)

Rozložení teplotních domén



C)

Perpendikulární DGGE



Obr. A) Fragменты pro zesilovač a promotor amplifikované PCR metodou a dělené ve 2% agarózovém gelu s následnou vizualizací pomocí EtBr. Jednotlivé stupně žebříčku se liší o 50 bp.

Obr. B) Obrázky ukazují rozložení teplotních domén u fragmentů určených k DGGE testovaných pomocí programu WinMelt. U obou fragmentů je zřetelně vidět uměle vložená doména (GC klemp) s nejvyšší teplotou tání. Šipka označuje místo, kam byla zanesena změna pomocí mutačních primerů pro účely pozitivní kontroly.

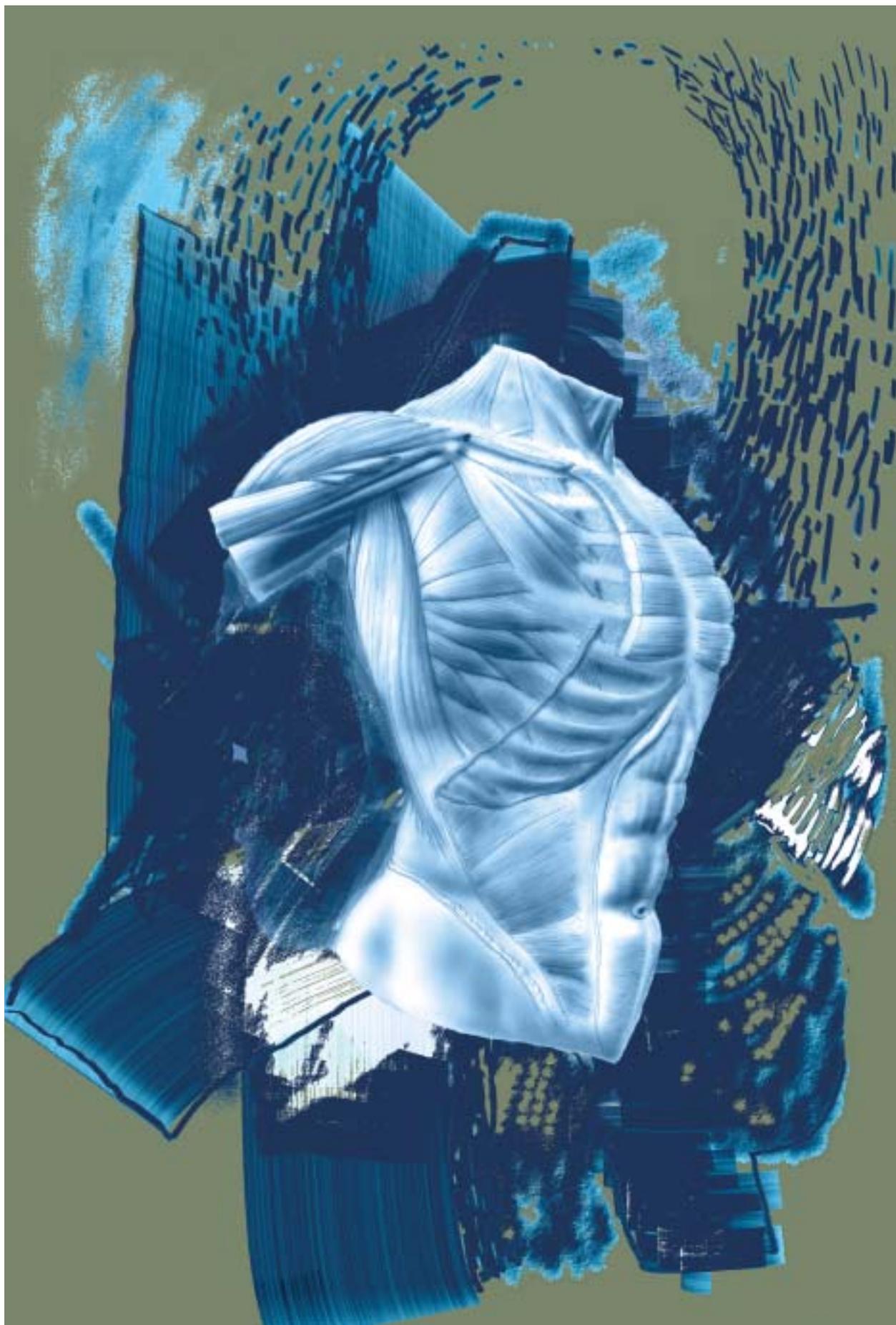
Obr. C) Obrázky ukazují výsledky perpendikulární DGGE. Fragmenty jely v 8% PAD, 1 l' h při napětí 130 V. Šipkama jsou označena místa, kde začíná a končí denaturace analyzovaného úseku a odpovídající koncentrace denaturačního činidla



Laboratoř Ústavu patologie 1. LF a VFN



Pitevna Anatomického ústavu 1. LF



SEKCE POSTGRADUÁLNÍ - POSTERY

UMÍSTĚNÍ

1. MÍSTO

Mgr. Habrdová Vilma, 5.r.

Školitel: doc. Ing. Marie Balíková, CSc.

Název práce:

„Comparison of Codeine Levels in Saliva and Serum after an Oral Codeine Administration“.

2. MÍSTO

Ing. Krejčí Eliška, 1.r., MUDr. Šnajdr, 1.r.

Školitel: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

Název práce:

„Exprese transkripčního faktoru c-Myb v kuřecím embryu a jeho role ve vývoji neurální lišty.“

3. MÍSTO

RNDr. Brabec Jiří, 2.r.

Školitel: prof. MUDr. Pavel Petrovický, DrSc.

Název práce:

„Změny objemů striata v závislosti na věku a jejich predikce za použití jednoduchého měření.“

1. místo

COMPARISON OF CODEINE LEVELS IN SALIVA AND SERUM AFTER AN ORAL CODEINE ADMINISTRATION**Author:** Vilma Habrdová**Advisor:** doc. Ing. Marie Balíková, CSc., Institute of Forensic Medicine and Toxicology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague*Vilma Habrdová*

The use of saliva or oral fluid specimens for drug analysis has been of great interest for years. Particular interest has been expressed for roadside drug testing of potentially intoxicated drivers because of advantages of saliva as a testing specimen e.g. non-invasive collection under direct observation. Similarly as other drugs, opiates may enter the oral cavity from two sources: they remain in the oral cavity after insufflation or inhalation of heroin or opium smoking, and/or opiates and their metabolites can be transferred into the oral cavity from blood.

The aim of the first part of the present study was to develop and validate a toxicological method for opiate determination in serum and saliva. The second part concerns with the experimental evaluation of the relationship between saliva and serum levels after oral codeine administration to volunteers.

Three drug-free volunteers were administered a single 60-mg dose of codeine phosphate. Saliva and serum specimens were collected at various times for 9 h after administration. The samples were prepared for GC-MS (gas chromatography – mass spectrometry) analysis using solid-phase extraction on SPEC Plus DAU discs and derivatized by silylation.

The average LOD (limit of detection) value for various opiates was 3 ng/ml in saliva and 5 ng/ml in serum. The coefficients of variation at concentration levels 10 and 100 ng/ml ranged between 1.7 - 6.0% for saliva, and 1.0 - 7.0% for serum. In authentic samples of volunteers, codeine levels were 2 to 4 times higher in saliva than in serum (the mean codeine concentrations 1 h after dose were 444 ng/ml for saliva compared to 97 ng/ml for serum). However, morphine levels in saliva were comparable to those determined in serum.

The relationships between serum and saliva drug levels strongly depend on the pH-value of saliva, contamination of oral cavity, salivary flow rate, and on the intensity of plasma protein binding of the drug. Therefore, there is no direct relationship between blood and saliva concentration values.

2. místo

EXPRESSE TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU C-MYB V KUŘECÍM EMBRYU A JEHO ROLE VE VÝVOJI NEURÁLNÍ LIŠTY

Autoři: Ing. Eliška Krejčí, MUDr. Pavel Šnajdr
Školitelé: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc, Anatomický ústav, 1. LF UK, RNDr. Michal Dvořák, CSc., Ústav molekulární genetiky, AV ČR



Ing. Eliška Krejčí



MUDr. Pavel Šnajdr

Transkripční faktor c-Myb je zatím znám jako jeden z klíčových regulačních prvků definitivní krvetvorby. Účastní se udržování populace nezralých myeloidních a erythroidních buněk. V průběhu jejich terminální diferenciaci exprese *c-myb* klesá až vymizí. Podle nepočtených literárních údajů je *c-myb* exprimován i v několika nekrvetočných tkáních. O jeho případné úloze v časných fázích embryonálního vývoje dosud není nic známo.

Ve svých experimentech jsme se soustředili právě na tato časná stadia vývoje kuřecího zárodku (stadium 2 – 18 podle Hamburgera a Hamiltona). Expresi genu *c-myb* jsme detegovali pomocí technik Western a Northern blot, hybridisací *in situ* a imunohistochemicky. Dále jsme pomocí inhibice exprese endogenního *c-myb* (antisense oligonukleotidy) a nadexprese exogenního *c-myb*, studovali na tkáňových explantátech neurální trubice a neurální ploténky roli tohoto transkripčního faktoru ve vývoji neurální lišty.

Zjistili jsme, že v kuřecím embryu je *c-myb* exprimován již velmi brzy, ve stadiu tvořícího se primitivního proužku. Jeho přítomnost není omezena pouze na určité primordiální struktury, ale detegujeme ji ve většině buněk. Výjimku tvoří pravděpodobně již diferenciované krevní buňky v primitivních cévách (krevní ostrůvky *c-myb* exprimují) a také individuální buňky uvnitř celého embrya, které mohou představovat různé buněčné typy. Předpokládáme, že všechny buňky, které neexprimují *c-myb*, již ztratily proliferativní potenciál.

Aplikace antisense oligonukleotidů na tkáňové explantáty neurální trubice vede k redukci počtu migrujících buněk neurální lišty. Tato redukce může být kompenzována expresí exogenního *c-myb*. Navíc antisense oligonukleotidy blokují indukci buněk neurální lišty v neurální ploténce, navozenou BMP4.

Z našich výsledků vyplývá, že v časných fázích vývoje kuřecího embrya je *c-myb* exprimován téměř ve všech proliferujících buňkách. Při vývoji neurální lišty je c-Myb zřejmě nezbytný pro její indukci a pro epithelo-mesenchymovou transformaci

Podpořeno granty: VZ 111100003-3 a GAČR 304/03/0463

3. místo

ZMĚNY OBJEMŮ STRIATA V ZÁVISLOSTI NA VĚKU A JEJICH PREDIKCE ZA POUŽITÍ JEDNODUCHÉHO MĚŘENÍ**Autor:** Jiří Brabec**Školitel:** prof. MUDr. Pavel Petrovický, DrSc., Anatomický ústav, 1. LF UK

Úvod: Volumetrie basálních ganglií je v poslední době velmi používanou metodou při stanovení klinické diagnózy a prognózy mnoha onemocnění. Předpokladem je jen dostatečné množství normálních, kontrolních hodnot. To však chybí ve většině dosud publikovaných prací. Cílem naší práce bylo (1) shromáždění velkého souboru normálních volumetrických údajů, potřebných ke (2) stanovení průměrného objemu striata, (3) s vyhodnocením jeho věkových změn a (4) nalezení jednoduchého měření, které by mohlo sloužit jako indikátor velikosti striata.

Metodika: Klasickými anatomickými metodami a NMR jsme u 108 zdravých dospělých (18-89 let) stanovili objemy striata; v rozdělení na komplex: caudatum-accumbens (CD-Acc) a putamen (Put), a statisticky je zpracovali. Výsledky: Průměrné hodnoty objemu striata jsou 7,48 cm³ (SD=0,94) pro muže a 7,42 cm³ (SD=0,95) pro ženy. Z toho na putamen v průměru připadá 51% a 50,3% ve stejném pořadí. Intersexuální ani interhemisférický rozdíl nebyl v absolutních objemech nalezen. Striatum se v závislosti na věku zmenšuje ($p < 0,0001$). Ve věkovém rozmezí 20-50 let pokles objemu činí 14,3% u mužů a 16,9% u žen. Rozdělení na dvě části ukázalo, že u mužů se komplex CD-Acc zmenší ve stejném věkovém rozmezí o 16,2%, zatímco u žen toto zmenšení nebylo prokázáno. Putamen se u mužů zmenšuje o 12,3%, u žen o 23,15%.

Plocha striata v řezu vedeném skrze commissura anterior vykazuje vysokou korelaci k jeho celkovému objemu ($p < 0,0001$, $r = 0,668$). Procentuální podíl tohoto řezu (1cm silný) je k celkovému objemu striata 28,56% (SD=3,05). Je proto velmi vhodný k orientačnímu měření.



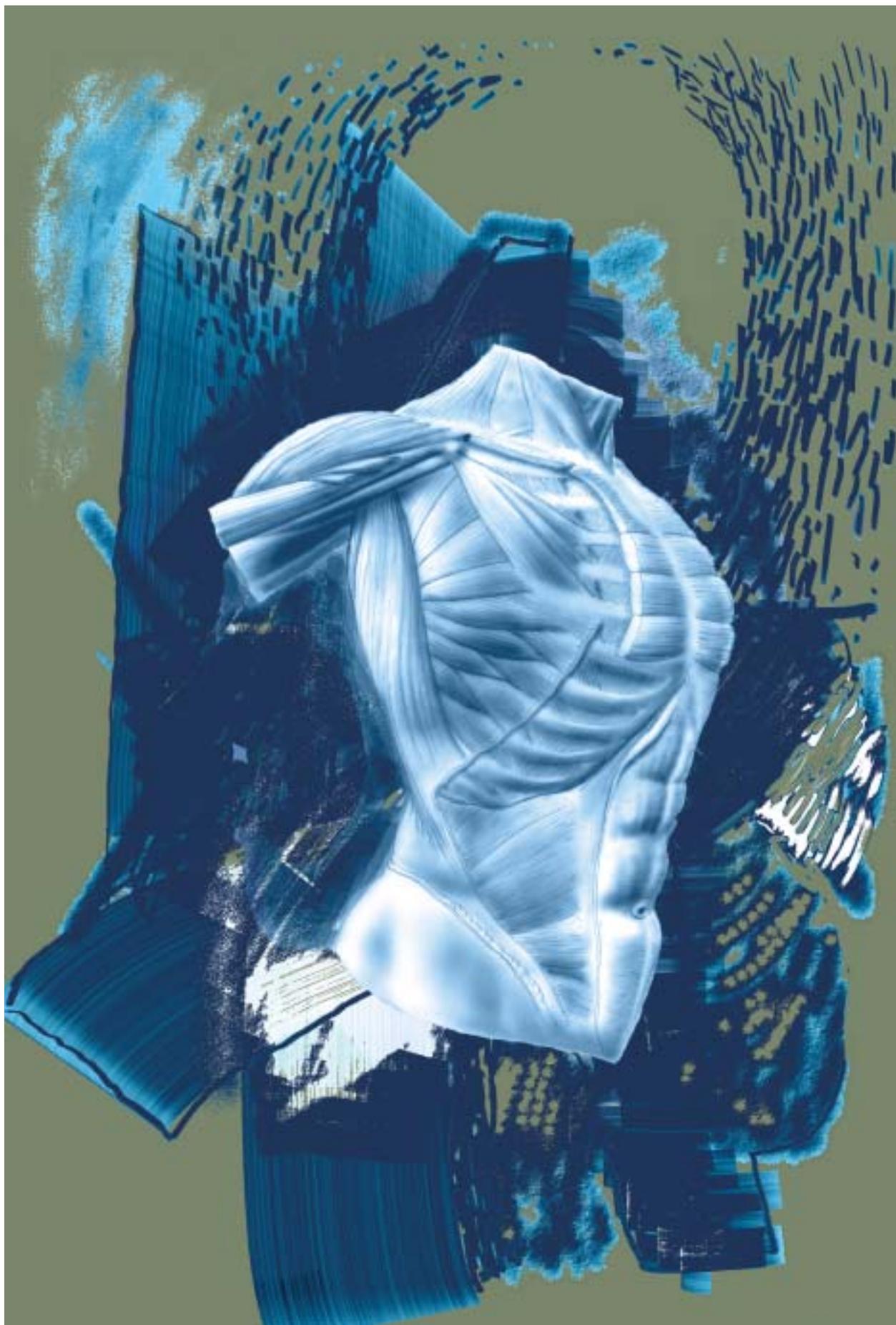
Jiří Brabec



Ústav patologie 1. LF a VFN



Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK



ZVLÁŠTNÍ CENA ZDRAVOTNICKÝCH NOVIN

AUTOR:

Jaromír Křemen, 5. ročník, 1. LF UK;

ŠKOLITEL:

doc. MUDr. Otokar Klein, CSc.

NÁZEV PRÁCE:

Opomíjené aspekty rizikového chování





OPOMÍJENÉ ASPEKTY RIZIKOVÉHO CHOVÁNÍ

Autor: Jaromír Křemen, 5. ročník
 Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta
 e-mail: jkrem@lf1.cuni.cz

Školitel: doc. MUDr. Otakar Klein, CSc.
 Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF UK a VFN
 Studničkova 7, 128 00 Praha 2

Přednosta: prof. MUDr. Vladimír Bencko, DrSc.



Jaromír Křemen

Souhrn

Úvod: Část výuky 5. ročníku na ústavu Hygieny a epidemiologie 1. LF UK v Praze je věnována tzv. terénní stáži, jejímž předmětem je seminář vedený mediky se studenty pražských středních škol zaměřený na prevenci HIV/AIDS a dalších pohlavních chorob. Součástí semináře je anketní šetření základních znalostí dospívající mládeže v této závažné problematice.

Metodika: Své šetření jsem rozšířil o údaje získané svými kolegy v letech 2000-2003, čímž vznikl soubor 910 studentů 13 pražských středních škol ve věku 14-19 let, z toho byli 303 studenti 4 gymnázií, 367 studentů 7 středních průmyslových škol, 161 student 1 střední zdravotní školy a 79 studentů 1 umělecké střední školy. Do souboru jsem vybral respondenty, kterým byly zadány shodné otázky. Anketa byla zaměřena na znalosti v problematice HIV/AIDS a dalších STD (způsoby přenosu, projevy onemocnění, ochrana před nimi, počty HIV pozitivních osob v ČR a ve světě).

Výsledky: Většina studentů našeho souboru vykázala znalosti o HIV/AIDS, kapavce a syfilis, avšak neměla znalosti o zdravotně závažné šířící se nákaze chlamydií trachomatis a hepatitidami typu C a B, i dalších STD jako jsou svrab, trichomoniáza, herpes genitalis, mykózy a další STD. Za závažné považují zjištění, že malá část respondentů považovala za ochranu před šířením STD i hormonální antikoncepci a další neúčinné metody. Přibližně jen pětina respondentů uvedla jako možnost přenos infekce transplacentárně z matky na dítě či infikovanou jehlou, naopak někteří považují za rizikový i samotný dotyk s nemocným. 40 % respondentů nevedlo žádný specifický příznak STD, pouze třetina studentů sledovaného souboru má představu o řádových počtech hlášených případů HIV/AIDS ve světě, správné údaje pro ČR udává dokonce jen 1/5.

Závěr: Uvedené šetření poukázalo na minimální znalosti dalších zdravotně závažných STD, z nichž některé nabraly na významu zvláště v posledním desetiletí, a to chlamydiových infekcí a hepatitidy typu C, šířící se hlavně mezi intravenózními uživateli drog (promořenost této populace činí až 70 %). Tyto mezery ve znalostech výše uvedenými chorobami ohrožené dospívající mládeže je nezbytné vyplnit

Část výuky 5. ročníku na ústavu Hygieny a epidemiologie 1. LF UK v Praze je věnována tzv. terénní stáži, jejímž předmětem je seminář vedený mediky se studenty pražských středních škol zaměřený na prevenci HIV/AIDS a dalších pohlavních chorob.

Semináře se skládaly ze dvou částí, v úvodu byl studentům zadán krátký dotazník zkoumající základní znalosti dospívající mládeže v této závažné problematice. Hodnocených otázek bylo celkem 5:

1. Kolik hlášených HIV pozitivních osob je ve světě a v ČR?
2. Jaké znáte pohlavně přenosné nákazy (STD)?
3. Jaké znáte způsoby přenosu STD?
4. Jaké projevy STD znáte?
5. Jaké znáte způsoby ochrany před STD?

Druhá část seminářů byla věnována diskusi se studenty, ve které jsme využili velkého zájmu a aktivní spolupráce studentů k odstranění nedostatků ve znalostech pohlavně přenosných chorob v éře HIV/AIDS a nitrožilního užívání drog, hlavní důraz byl kladen na rozšíření informací o celém spektru pohlavně přenosných nákaz, upřesnění možností přenosu a ochrany před šířením infekce HIV/AIDS a dalších STD a seznámení studentů s riziky nitrožilního užívání drog, zvláště pak s infekčními hepatitidami typu B a C.

Své šetření jsem rozšířil o údaje získané svými kolegy v letech 2000-2003, čímž vznikl soubor 910 studentů 13 pražských středních škol ve věku 14-19 let, z toho byli 303 studenti 4 gymnázií, 367 studentů 7 středních průmyslových škol, 161 student 1 střední zdravotní školy a 79 studentů 1 umělecké střední školy.

Základní orientace v řádových počtech hlášených HIV pozitivních osob ve světě a ČR napomáhá v uvědomění si rizik nákazy. V této oblasti se studenti příliš neorientují a počty spíše odhadují. Pouze třetina studentů sledovaného souboru má představu o řádových počtech hlášených případů HIV/AIDS ve světě (správně desetimiliony), správné údaje pro ČR (stovky) udává dokonce jen 1/5. Je zajímavé, že až na studenty umělecké školy počty ve světě podhodnocují a v ČR naopak výrazně nadhodnocují.

1A. KOLIK PŘÍPADŮ HIV JE HLÁŠENO VE SVĚTĚ?

Řádově	Gymnázia n=128	SPŠ n=78	SZŠ n=122	Um. škola n=27	Průměr n=355
tisíce	0,8	7,7	0	0	2,1
10tis.	0,8	0	2,5	0	1,2
100tis.	6,3	3,8	1,5	0	7,1
miliony	29,7	26,9	32,0	26,0	29,7
10mil.	32,0	56,4	13,1	0	28,8
100mil.	18,0	0	5,7	11,1	9,3
miliardy	2,3	5,2	7,4	51,9	8,7

údaje v procentech

1B. KOLIK PŘÍPADŮ HIV JE HLÁŠENO V ČR?

Řádově	Gymnázia n=142	SPŠ n=167	SZŠ n=133	Um. škola n=50	Průměr n=492
desítky	3,5	0	0	0	1,0
sta	31,7	5,4	19,5	18,0	18,7
tisíce	16,9	17,4	30,1	22,0	21,1
10tis.	24,6	28,7	18,0	26,0	24,4
100tis.	12,7	19,2	18,0	8,8	16,1
miliony	0,7	8,4	7,5	14,0	6,7
Neví	9,9	20,9	6,8	12,0	12,0

údaje v procentech

Znalost HIV/AIDS, kapavky a syfilis se dá u středoškoláků přepokládat, v tomto ohledu zaostávají pouze studenti umělecké školy, kde kapavku či syfilis udalo méně než 50 % studentů. Alarmující je však téměř absolutní neznalost zdravotně závažných chlamydiových infekcí a výrazné opomíjení infekčních hepatitid typu B a C, které se šíří zvláště v populaci nitrožilních uživatelů drog. Rovněž by studenti měli znát herpesvirové, parazitární (svrab, muňky, trichomoníáza) a mykotické infekce.

2. JAKÉ ZNÁTE POHLAVNĚ PŘENOSNÉ NÁKAZY?

Řádově	Gymnázia n=303	SPŠ n=286	SZŠ n=142	Um. škola n=79	Průměr n=810
HIV/AIDS	84,5	89,9	97,9	92,4	89,5
Kapavka	84,2	82,5	90,1	41,8	80,4
Syfilis	81,5	80,4	87,3	32,9	77,4
Chlamydie	0	0,3	0,7	0	0,2
Hepatitis	10,2	6,3	19,0	21,5	11,4
HSV-2	3,3	1,0	2,8	0	2,1
Mykózy	1,0	0	2,1	3,8	3,2
Paraz. o.	2,9	3,1	2,8	3,8	3,2
Jiné	6,3	4,5	2,1	19,0	6,1
Neví	2,3	2,1	0,7	0	1,7

údaje v procentech

Důležitá je znalost širšího spektra způsobů přenosu STD. Přenos pohlavním stykem či krví považujeme za samozřejmost. Zde bych upozornil především na časté neuvedení možnosti nákazy infikovanou injekční jehlou, studenti by měli znát i možnost přenosu infekce z matky na dítě, ať již transplacentárně, při porodu, či

2. JAKÉ ZNÁTE ZPŮSOBY PŘENOSU STD?

Řádově	Gymnázia n=199	SPŠ n=268	SZŠ n=105	Um. škola n=79	Průměr n=651
Pohlavní styk	95,0	79,9	92,4	74,7	87,1
Krev	80,9	94,4	99,0	60,8	86,7
Matka-plod	23,6	19,4	26,7	29,1	23,0
Nakažená jehla	18,6	10,4	15,2	60,8	19,6
Jinak	20,6	7,8	17,1	6,3	13,0
Neví	0	3,4	1,0	0	1,5

údaje v procentech



2. JAKÉ PROJEVY STD ZNÁTE?

Řádově	Gymnázia n=228	SPŠ n=121	SZŠ n=90	Um. škola n=27	Průměr n=466
Výtok	21,0	19,8	21,1	11,1	20,1
Vřed	16,7	9,9	18,9	3,7	14,5
Kožní projevy	21	16,5	30	3,7	20,6
Snížení imunity	26,3	33,9	14,4	0	24,5
Nespecif. příznaky	25,9	38,0	35,6	18,5	30,5
Horečka	10,1	0,8	2,2	0	5,6
Terc. syfilis	4,4	5,0	7,8	0	5,0
Jinak	8,3	38,8	5,6	22,2	16,5
Neví	27,2	0	28,9	50	18,9

údaje v procentech

mateřským mlékem. Tyto dvě možnosti nevedlo přibližně 80 % respondentů. Padly i chybné odpovědi jako pouhý dotyk nemocného, kousnutí hmyzem, apod.

Každý člověk by měl znát příznaky pohlavně přenosných chorob, aby je byl schopen včas odhalit, vyhledat odbornou pomoc a zabránit jejich dalšímu šíření, a vyhnul se tak jejich nepříjemným komplikacím. V této oblasti jsme dospěli k závěru, že středoškoláci mají značně nekonkrétní představy, více než polovina nevedla žádný specifický příznak.

5. JAKÉ ZNÁTE ZPŮSOBY OCHRANY PŘED STD?

Řádově	Gymnázia n=303	SPŠ n=367	SZŠ n=161	Um. škola n=79	Průměr n=910
Kondom	91	86,6	90,7	68,3	87,0
Sexuální abstin.	19,1	14,4	13,7	1,3	14,7
Věrnost	22,1	24	29,4	16,5	23,6
Hormon. antikonc.	7,9	3,3	12,4	35,4	8,2
Testování	5,3	1,4	8,7	14,0	5,1
Čisté jehly	13,2	14,2	5,0	11,4	11,9
Jiné	8,6	5,2	6,8	17,7	7,7
Neví	0	4,6	0	0	2,2

údaje v procentech

Dokonalá znalost a využívání ochrany před pohlavními nákazami jsou pilíři prevence jejich šíření. Proto je závažné, že někteří studenti považují za ochranu před šířením STD hormonální antikoncepci (tuto možnost uvedlo až 35% studentů umělecké školy) a další neúčinné metody jako osobní hygienu, lubrikační gely, nebo metody přímo rizikové jako je orální sex. Rovněž lze za ochranu před STD, zvláště pak HIV/AIDS a hepatitidami, považovat používání čistých injekčních jehel, dále věrnost, testy. Tyto možnosti však uvedla přibližně 1/10 respondentů.

K následné diskusi, ve které jsme se snažili studentům výše uvedené nedostatky objasnit, přistupovali studenti velmi aktivně. Snažili jsme se daným tématem zabývat zeširoka, abychom studenty příliš nezahltili kvantou informací, ale zároveň komplexně postihli jak oblast samotných STD, tak i aspekty s těmito chorobami související.

Při probírání problematiky nitrožilního užívání drog jsem nabyl dojmu, že jsou studenti poučeni o možných psychosociálních důsledcích drogové závislosti více než o vysokém riziku nákazy těmito chorobami, zvláště od

narkomanské populace, u které činí promořenost více než 70%. Proto jsou ohroženi zvláště tzv. experimentátoři, kteří se sice po jedné dávce drogy závislími nestanou, ale s vysokou pravděpodobností se nakazí nebezpečnou chorobou, která jim zničí celý život.

Literatura:

1. Alena Lobovská: *Infekční nemoci*, 1. vydání, Karolinum Praha 2002
2. Marek Bednář a kol.: *Lékařská mikrobiologie*, 1. vydání, Marvil 1996
3. Hanuš Rozsypal: *AIDS, klinický obraz a léčba*, Maxdorf 1998
4. V. Resl a kol.: *Venerologie*, 1. vydání, Karolinum 1993
5. *další literatura k dispozici u autora*



Cenu Zdravotnických novin předal Jaromíru Křemenovi šéfredaktor Dr. Tomáš Cikrt.

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA DĚKUJE SPONZORŮM KONFERENCE





Zpracovalo Oddělení vnějších vztahů UK v Praze – 1. LF

Vydalo nakladatelství Galén, Na Bělidle 34, 150 00 Praha 5 jako účelovou publikaci 1. LF UK v Praze

Ilustrace, grafická úprava a návrh obálky ak. mal. Ivan Helekal

Fotografie Irena Černá a Mgr. Karel Meister

Sazba Vojtěch Kočí, Galén

Tisk GLOS, Špidlenova 436, 513 01 Semily

ISBN 80-7262-230-7