

7. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE



Konaná dne 22. května 2006
pod záštitou děkana 1. LF UK
prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc., MBA

7. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

Konaná dne 22. května 2006



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

OBSAH

Slovo úvodem	3
Pozvánka	4
Seznam účastníků	5
Hodnotitelská komise	7
ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ	9
Sekce pregraduální – teoretická část	10
Sekce pregraduální – klinická část	18
Sekce postgraduální – přednášky	28
Sekce postgraduální – postery	40
VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO	51
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST	52
Vyšetření inaktivace chromosomu X pomocí methylačně specifické PCR – Jakub Minks	53
Regulation of Rap 1 GAP2/14-3-3 binding is a novel mechanism of prostacyclin and nitric oxide inhibitory function in human platelets – Pavel Říha	55
Charakteristika dynamiky genetické analýzy metabolického syndromu na základě diferenciální vazebné analýzy – Iva Ullmanová	61
SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST	66
Polymorfismy genů pro adiponectin a resistin u pacientek s mentální anorexií a obezitou – pilotní studie – Štěpán Sulek	67
Úroveň endodontického ošetření obyvatel České republiky a jeho vliv na onemocnění periapikálních tkání – Pavel Kusák	71
Protilátky proti fosfatidylethanolaminu (aPe) u pacientů s trombózami – Kristýna Mášová	74
Protilátky proti Annexinu V jako rizikový faktor opakovaných spontánních potratů – Radka Švancarová	77
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY	80
Expression of cellular prion protein on human erythrocytes – Martin Panigaj	81
Influence of Sonic hedgehog onto the aortic arches development in avian embryos – Hana Kolesová	85
Význam endokrinní funkce tukové tkáně u kriticky nemocných – Jaromír Křemen	91
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY	94
Ochrana myokradu leukocytární filtrací při srdeční transplantaci: výsledky klinické studie – Luboš Dvořák	95
Vliv korozního prostředí na pevnost vazby mezi dentinem a kompozitními výplňovými materiály – Michal Dudek	96
Study of biochemical properties of mouse recombinant prion protein – Alexandr Pavlíček	97
ZVLÁŠTNÍ CENY	100



1. lékařská fakulta UK v Praze je jednou z nejvýznamnějších vzdělávacích a vědeckých institucí v České republice uznávanou v zahraničí, což vychází jak z jejích tradic tak i z jejího současného postavení. Unikátnost teoretických ústavů a jejich propojení s klinickými pracovišti fakultu nepřímo staví do role výlučné instituce. 1. lékařská fakulta je významným centrem lékařského a biomedicínského výzkumu v ČR a pro další kvalitativní rozvoj tohoto výzkumu je nutné vychovávat a pomáhat s vědeckou prací našim studentům, kteří budou jednou na naši práci navazovat a rozvíjet ji. Vedení fakulty ve snaze navazovat na vše pozitivní co v minulosti vzniklo a v reflexi na trendy, které se v současné době na našich i zahraničních vysokých školách rozvíjejí, obnovilo konání studentských vědeckých konferencí.

Tradice vědeckých konferencí byla obnovena v roce 2000 a její letošní již 7. ročník jen potvrdil, že tento krok pro podporu rozvoje tvůrčího potenciálu pregraduálních a postgraduálních studentů byl krokem správným. Studenti by již v rámci pregraduálního studia měli participovat na výzkumné činnosti fakulty a fakultních nemocnic a je na nás jim ukázat krásu vědeckého bádání a objevování neznámého. Studentská vědecká činnost na naší fakultě by neměla být jen "těsně" před soutěží o nejlepší práci, proto vedení fakulty od akademického roku 2006/7 umožnilo, aby byla celoroční činností se zařazením mezi volitelné předměty.

Kvalita všech 81 prací, které byly do soutěže přihlášeny, byla i v letošním roce velmi dobrá. Bylo oceněno celkem 13 vítězných prací a to ve čtyřech sekcích – dvou pregraduálních (teoretická a klinická) a dvou postgraduálních (přednášky a poster). Zvláštní ceny pro tři vybrané oceněné vítěze ještě navíc udělovaly redakce Medical Tribune, Zdravotnických novin a nakladatelství Galén s.r.o. I když počtem prací byly pregraduální sekce poměrně dobře zastoupeny, je mým přáním, aby právě na těchto konferencích především pregraduální studenti ve větší míře začínali a zkusili si přednést a obhájit svoje výsledky. Nejlepší vybrané práce postoupí do celostátního kola, které se bude konat na podzim 2006 a budou po recenzním řízení otištěny v Prague Medical Report.

Chci poděkovat předsedům, všem členům hodnotících komisí, také pracovnícům oddělení pro vědy 1. LF, které se na přípravě letošní studentské konference podílely a zejména učitelům, kteří se pregraduálním a postgraduálním studentům po celý rok a seznamují je s lékařskou vědou.

I letošní ceny, které fakulta mohla předat studentům byly jistě velmi zajímavé a mohly být uděleny s laskavou podporou firem Olympus, s.r.o., Astra Zeneca Czech Republic s.r.o., nakladatelství Galén, s.r.o., nakladatelství Grada Publishing a.s., redakce Medical Tribune a redakce Zdravotnických novin.

Přeji nám všem, aby i budoucí ročníky studentské vědecké činnosti na naší 1. lékařské fakultě byly stejně tak úspěšné, jako ten letošní.

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



Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., děkan Univerzity Karlovy v Praze, 1. lékařské fakulty

7. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

1. lékařské fakulty

konaná pod záštitou děkana 1. LF

Prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc.

22. KVĚTNA 2006

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

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

Studentská vědecká konference bude uspořádána ve dvou sekcích. Sekce postgraduálních prací a sekce pregraduálních prací.

SEKCE PREGRADUÁLNÍCH PRACÍ bude probíhat 22. května 2006 od 8.15 hodin v posluchárně Stomatologické kliniky 1. LF, Kateřinská 32, Praha 2.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍCH PRACÍ bude probíhat 22. května 2006 od 8.15 hodin ve Velké zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2.

Prezentace proběhne na základě hodnocení komise formou přednášky nebo posteru.

Práce mohou být prezentovány v českém i anglickém jazyce. Doba přednášky bude maximálně 10 minut a prostor pro diskusi 5 minut. K dispozici bude dataprojektor, zpětný projektor a diaprojektor s možností dvouprojekce a postery (rozměr 160×120 cm).

Účastníky konference žádáme, aby si přinesli svůj osobní notebook.

K pozvánce je přiložen časový harmonogram jednotlivých vystoupení.

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

Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA
děkan 1. lékařské fakulty

Veškeré informace o konání SVK:

Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky 1. LF

Karolína Havelková, tel.: 224 964 330

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

Přijměte, prosím pozvání na slavnostní vyhlášení výsledků 7. studentské vědecké konference 1. LF, které se bude konat dne 7. 6. 2006 ve 14.30 hod. v Akademickém klubu 1. LF, Faustův dům, Karlovo nám. 40, Praha 2.

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc. MBA
děkan 1. LF

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA DĚKUJE SPONZORŮM KONFERENCE



OLYMPUS



**Zdravotnické
noviny**

Seznam účastníků

SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST

- Bryšková Žaneta, Bc., 2. r.
- Handlos Petr, 4. r.
- Havránek Ondřej, 5. r.
- Hlavatá Jitka, 5. r.
- Krupková Michaela, 4. r.
- Leahomschi Sergiu, 4. r.
- Minks Jakub, 4. r.
- Morysová Marie, 3. r.
- Nováková Martina, 5. r.
- Říha Pavel, 5. r.
- Šenkýřová Štěpánka, 3. r.
- Špačková Jana, 5. r.
- Ullmanová Iva, 3. r.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST

- Bocková Lucia, 5. r.
- Dziaková Jana, 5. r.
- Feltlová Eliška, 2. r.
- Germanová Alexandra, 4. r.
- Hippmann Radek, 5. r.
- Stebel Jakub, 6. r.
- Kalužová Marie, 5. r.
- Kaniok Radek, 4. r.
- Kusák Pavel, 5. r.
- Kociánová Eva, 2. r.
- Krajíčková Jana, 4. r.
- Mášová Kristýna, 4. r.
- Pasteláková Blanka, 2. r.
- Racková Eva, 5. r.
- Wallenfelsová Eva, 5. r.
- Vnenková Eva, 5. r.
- Sulek Štěpán, 5. r.
- Špeldová Andrea, 2. r.
- Švancarová Radka, 4. r.
- Ténajová Jana, 6. r.
- Všeticka Jan, 6. r.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY

- Babická Libuše, Mgr., 2. r. PGS
- Broučková Adéla, Ing., 3. r. PGS
- Bugarová Michaela, MUDr., 6. r. PGS
- Čtrnáctá Vlasta, Mgr., 3. r. PGS
- Doležalová Radka, MUDr., 3. r. PGS
- Douša Miroslav, MUDr., 2. r. PGS
- Fraško Roman, MUDr., 7. r. PGS
- Houšková Lucie, Mgr., 2. r. PGS
- Jatchvliani Dato, MUDr., 4. r. PGS
- Kmoch Vladimír, MUDr., 2. r. PGS
- Koblížek Vladimír, MUDr., 3. r. PGS
- Kolesová Hana, Mgr., 3. r. PGS
- Kopečková Marta, Mgr., 4. r. PGS
- Křemen Jaromír, MUDr., 2. r. PGS
- Lehký Jan, MUDr., 1. r. PGS
- Panigaj Martin, Mgr., 3. r. PGS
- Podrazilová Lucie, MUDr., 5. r. PGS
- Pohludka Michal, Ing., 2. r. PGS
- Rathous Ivo, MUDr., 5. r. PGS
- Riljak Vladimír, MUDr., 2. r. PGS
- Stremeňová Jarmila, 2. r. PGS
- Vaňková Zdenka, MUDr., 3. r. PGS
- Vohánka Jaroslav, Ing., 2. r. PGS
- Vojtová Lucie, Ing., 2. r. PGS
- Zagatová Veronika, MUDr., 2. r. PGS
- Zelenka Jaroslav, Ing., 2. r. PGS

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY

- Aster Viktor, MUDr.
- Božanská Lenka, MUDr., 1. r. PGS
- Bysterská Petra, Mgr., 2. r. PGS
- Čada Zdeněk, MUDr., 1. r. PGS
- Čížek Zdeněk, 3. r. PGS
- Dudek Michal, MUDr., 1. r. PGS
- Dvořák Luboš, MUDr., 5. r. PGS
- Fábín Petr, Mgr., 2. r. PGS
- Glierová Hana, Mgr., 2. r. PGS
- Holdis Jiří, MUDr., Mgr., 2. r. PGS
- Kalmárová Markéta, Mgr., 5. r. PGS
- Kastner Jan, MUDr., 1. r. PGS
- Kettnerová Martina, MUDr., 2. r. PGS
- Kokavec Juraj, Mgr., 1. r. PGS
- Lačňák Zdeněk, MUDr., 2. r. PGS
- Linetskiy Igor, D.M., 2. r. PGS
- Lišková Jana, Mgr., 3. r. PGS
- Macášek Jaroslav, MUDr., 1. r. PGS
- Nawka Alexander, MUDr., 1. r. PGS
- Otčenášková Martina, Mgr., 1. r. PGS
- Pavlíček Alexandr, 2. r. PGS
- Prokopcová Jana, Mgr., 2. r. PGS
- Sedlář Martin, MUDr., 2. r. PGS
- Šcholzová Eva, Ing., 3. r. PGS
- Šulová Martina, Mgr., 2. r. PGS
- Trča Stanislav, MUDr., 5. r. PGS

HODNOTITELSKÉ KOMISE



PREGRADUÁLNÍ SEKCE

ČÁST TEORETICKÁ

předseda: **prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.**
člen: doc. MUDr. Ivan Matouš – Malbohan, CSc.

ČÁST KLINICKÁ

předseda: **prof. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc.**
člen: doc. MUDr. Richard Češka, CSc.

POSTGRADUÁLNÍ SEKCE

PŘEDNÁŠKY

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

POSTERY

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

SEKCE PREGRADUÁLNÍ TEORETICKÁ ČÁST



ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE PREGRADUÁLNÍ – TEORETICKÁ ČÁST

- Bryšková Žaneta, Bc., 2. r.
- Handlos Petr, 4. r.
- Havránek Ondřej, 5. r.
- Hlavatá Jitka, 5. r.
- Krupková Michaela, 4. r.
- Leahomschi Sergiu, 4. r.
- Minks Jakub, 4. r.
- Morysová Marie, 3. r.
- Nováková Martina, 5. r.
- Říha Pavel, 5. r.
- Šenkýřová Štěpánka, 3. r.
- Špačková Jana, 5. r.
- Ullmanová Iva, 3. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

předseda: **prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.**

člen: doc. MUDr. Ivan Matouš – Malbohan, CSc.



STANOVENÍ PODOCYTŮ V MOČI METODOU PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE U ZÁNĚTLIVÝCH ONEMOCNĚNÍ LEDVIN

Autorka: Bc. Žaneta Bryšková, 2. r.

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

Úvod: Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující současné měření řady parametrů na velkém množství částic. Již dříve prezentované studie prokázaly, že močové podocyty jsou známkami glomerulárního poškození. Podocyty mají omezenou schopnost buněčného dělení a poškození vede ke snížení jejich počtu. Podocyturie odráží aktivitu a závažnost glomerulárního poškození. Cílem této práce bylo vypracovat metodiku analýzy buněk močového sedimentu pacientů s onemocněními glomerulů na průtokovém cytometru.

Metodika: Průtoková cytometrie je založena na imunofluorescenci nebo na stanovení obsahu buněčné DNA. Při detekci podocytů v moči jsem užívala monoklonální protilátky proti podocalyxinu, značené phycoerythrinem (PE), a protilátky proti cytokeratinům, značené fluoresceinizothiocyanatem (FITC). Gate byl stanoven pomocí propidium jodidu, který penetruje pouze buněčnou membránou mrtvých buněk. Hlavním hlediskem byla správná volba separace močového sedimentu. Nejvíce zdařilou metodou se stala separace ultrafiltrací na systému Millipore (ultrafiltry s otvory o průměru 5 μm).

Výsledek: Nejvýznamnějším výsledkem mé práce je vypracování standardní metody separace a značení podocytů pro měření na průtokovém cytometru. Provedla jsem analýzu močových sedimentů u 13 náhodně vybraných pacientů s akutním zánětlivým onemocněním ledvin. Podocyty chyběly u zdravých kontrol. Nejvyšší naměřené hodnoty výskytu podocytů v močovém sedimentu byly 35,43%, 56,49%, 70,44%. U pacienta s naměřenou hodnotou až 40% podocytů v močovém sedimentu došlo po imunosupresivní terapii k poklesu na 16,28%.

Závěr: Byla nalezena vhodná metoda zpracování a separace močového sedimentu s následným značením pomocí monoklonálních protilátek. Eliminována se autofluorescence močového sedimentu. Tato metoda uchovává životaschopnost podocytů. Domnívám se, že je třeba vyzkoušet dvojí značení s použitím druhého specifického znaku podocytů.

ULTRASTRUKTURA KARDIOMYOCYTŮ EXCITOMOTORICKÉHO SYSTÉMU

Autor: Petr Handlos, 4. r.

Školitel: prof. MUDr. Libor Páč, CSc., Anatomický ústav LF MU v Brně

Úvod: Prokázat přítomnost kardiomyocytů excitomotorického systému ve stěně vv. pulmonales srovnáním ultrastruktury těchto kardiomyocytů s kardiomyocyty nacházejícími se v nodus sinoatrialis a nodus atrioventricularis.

Metodika: Vv. pulmonales a myokard z oblasti nodus atrioventricularis a nodus sinoatrialis pro potřeby elektronové mikroskopie byl získán z 5 srdcí dospělých jedinců mužského pohlaví ve věku od 26 do 52 let odstraněných při transplantaci tohoto orgánu na CKTCH v Brně.

Výsledky: Ve všech vyšetřovaných vv. pulmonales jsme prokázali kromě kardiomyocytů kontraktálního myokardu, kardiomyocyty zcela odlišné strukturní stavby. Po jejich detailním srovnání s kardiomyocyty nacházejících se v nodus sinoatrialis a nodus atrioventricularis jsme dospěli k závěru, že námi nalezené kardiomyocyty jsou součástí excitomotorického systému srdce.

Závěr: Kardiomyocyty excitomotorického systému jsou relativně konstantní součástí tunica media vv. pulmonales, což potvrzuje klinická pozorování, kdy atypické nekoordinované a zřejmě nenormální výboje kardiomyocytů těchto ostrůvků převodního systému ve stěně vv. pulmonales vedou k fibrilacím síní.

ANALÝZA MUTACE 1100DEL C GENU *CHEK2* V POPULACI PACIENTŮ SE SPORADICKÝM KARCINOMEM KOLOREKTA A FAMILIÁLNÍ ADENOMATÓZNÍ POLYPÓZOU

Autor: Ondřej Havránek, 5.r.

Školitel: MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK

Úvod: Česká republika patří mezi státy s nejvyšší incidencí kolorektálního karcinomu. Přestože je většina kolorektálních karcinomů sporadického původu, významnou část pacientů, především z hlediska prediktivní onkologie, tvoří nemocní s výskytem hereditárních karcinomů. Do současné doby byla objevena řada genů, jejichž mutace zvyšují riziko vzniku kolorektálního karcinomu (*APC*, *MLH1*, *MSH6*, *SMAD4*, *BMPR1a*) a vedou k rozvoji hereditárních nádorových syndromů s nebo bez výskytu polypů, jako je například familiární adenomatózní polypóza (FAP). Intenzivní pozornost je věnována rovněž modifikaci nádorového rizika na základě mutací v tzv. „genech s nízkou penetrancí“. Mezi tyto geny patří i gen *CHEK2*, u kterého byla popsána patogenní mutace 1100delC podílející se na vzniku syndromu hereditárního výskytu kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu.

Metody: Provedli jsme detekci patogenní mutace *CHEK2* c.1100delC u 433 pacientů s kolorektálním karcinodem a 113 pacientů s FAP. Mutace byly analyzovány pomocí denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (DHPLC) PCR produktu zahrnujícího exon 10 genu *CHEK2*. Nalezené mutace byly ověřeny sekvenováním na automatickém sekvenátoru ABI310.

Výsledky: V souboru 433 pacientů jsme identifikovali celkem 3 nosiče sledované mutace (0,7%); v souboru pacientů s diagnózou FAP nebyla studovaná mutace nalezena.

Závěry: Výskyt alely CHEK2*1100delC je v České republice nízký. Ačkoliv četnost nálezu mutace v populaci pacientů s kolorektálním karcinomem je vyšší než v nenádorové populaci, je pravděpodobné, že nosiči mutace představují méně než 1% všech nemocných.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem Ligy proti rakovině Praha 2005

SROVNÁNÍ METODY IMMUNODOT A ELISA PRO DETEKCI SÉROLOGICKÝCH MARKERŮ CELIAKIE

Autor: Jitka Hlavatá, 5.r.

Školitel: MUDr. Petr Kocna, CSc., Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Cílem studie je porovnání dvou technologií detekce sérologických markerů celiakie, klasické ELISA metody a moderního jednoduchého testu ImmunoDot.

Metodika: Stanoveny byly protilátky AGA-A, AGA-G, atTG-A a atTG-G metodou ELISA (Dialab) a BlueDot (Biovendor). Vyhodnoceno bylo 96 nemocných ve třech kategoriích hodnot.

Výsledky: V případě negativní atTG-A (<10U/ml) a vysoce pozitivní atTG-A (80-205U/ml) se obě techniky shodly ve 100%. Hodnoty atTG-A lehce nad hranicí cut-off 10-20U/ml (n=32) byly vyhodnoceny metodou ImmunoDot v 56,2% pozitivně a v 43,8% negativně.

Pro atTG-G hodnoty získané metodou ImmunoDot mnohem lépe odpovídaly ostatním sérologickým markerům, a to v celém spektru. U obou pacientů, kteří měli velmi nízkou hodnotu atTG-A a velmi vysokou hodnotu AGA-G, byly shodně stanoveny vysoké hodnoty i pro atTG-G narozdíl od rutinních testů.

Závěry: Stanovení AGA-A a AGA-G se liší celkově ve 20,8% případů. Důvodem je pravděpodobně zvolený antigen - gliadin, rutinně používaná metoda ELISA pracuje s purifikovaným α -gliadinem.

Srovnáním vizuálního hodnocení (negativní, pozitivní) a softwarového hodnocení opticky scanovaných proužků (hodnoceno indexem 0-100) jsme dospěli pouze k 8,6% rozporů, v naprosté většině těchto případů byl negativní výsledek vizuálně chybně určen jako pozitivní.

Metoda ImmunoDot je jednoduchou a spolehlivou variantou detekce protilátek a je vhodná pro menší laboratoře, kde by metoda ELISA byla příliš nákladná.

GEN KÓDUJÍCÍ PROMYELOCYTE LEUKEMIA ZINC FINGER PROTEIN (PLZF) JAKO KANDIDÁT PRO SYNDROM POLYDAKTYLIE LUXACE U POTKANA

Autoři: Michaela Krupková, 4. r., František Liška, Lucie Šedová, Ondřej Šeda, Drahomíra Křenová, Vladimír Křen

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

Úvod: Spontánní mutace modelových organismů jsou významným prostředkem pro odhalování funkcí genů a vývojových genetických mechanismů. Mutantní gen *Lx* je odpovědný za syndrom polydaktylie-luxace potkana (PLS), jehož hlavním projevem je preaxiální polydaktylie zadních končetin. Mutantní gen *Lx* mapuje na chromozom 8 do oblasti homologické myšimú chr. 9 a lidskému chr.11q24. Homologická oblast myšimú chr.9 kóduje syndrom luxoid podmíněný mutací genu *Plzf*, který je rovněž kandidátem pro mutaci *Lx* potkana. *Plzf* kóduje transkripční faktor, který je mimo jiné negativním regulátorem RAR (retinoic acid receptor) genu.

Materiál a metody: Výchozími potkaními kmeny pro vytvoření genetického modelu malformačního syndromu byl inbrední normodaktylní hypertenzní kmen SHR a dárce mutantní alely *Lx* byl polydaktylní kmen PD/Cub. Produkce kongenního kmene SHR.*Lx* s postupným zužováním PD segmentu chr.8 s mutantní alelou *Lx* s použitím PCR detekce rekombinací. Testování interakce mutace *Lx* s kyselinou retinovou její perorální aplikací březím samicím a diferenciální barvení fétů na kost a chrupavku.

Výsledky: Při vývoji kongenního kmene byl segment s genem *Plzf* zúžen z původních 30Mb až na 0.5 Mb při zachování fenotypu preaxiální polydaktylie. Mutace mění fenotypové projevy malformačního účinku kyseliny retinové. Sekvenací nebyla prokázána mutace v kódujících oblastech *Plzf*.

Závěr: *Plzf* zůstává nejpravděpodobnějším kandidátním genem pro PLS, ale na rozdíl od myši luxoid jde o mutaci v regulační oblasti.

ANALÝZA EXPRESE APOPTOTICKÝCH GENŮ U TRAIL-SENZITIVNÍCH A REZISTENTNÍCH BUNĚK LEUKEMICKÉ LINIE HL60

Autoři: Sergiu Leahomschi, 4. r., Pavel Klener Jr., Jan Živný

Školitel: MUDr. Jan Živný, Ph.D, Ústav patologické fyziologie 1. LF UK

Akutní leukémie představují široké spektrum maligních onemocnění klonálního charakteru s dosud omezenými možnostmi účinné terapie. TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) spouští apoptózu u mnoha typů maligních buněk, zatímco normální buňky jsou vůči TRAILu rezistentní. Rezistence vůči apoptóze se často spojuje se změněnými expresemi regulátorů apoptózy, jako například cFLIP, členy rodiny BCL2, proteinů inhibujících apoptózu (IAPs),



TRAILu a jeho receptorů, proteinů DISCu (Death inducing signaling complex), aj. Cílem studie bylo provedení komparativní analýzy exprese širokého spektra významných apoptotických regulátorů u HL60 TRAIL-rezistentních linií a u kontrolní TRAIL-senzitivní HL60 linie za účelem zjištění možných molekulárních mechanismů vzniku rezistence vůči receptory spouštěné apoptóze. Analyzovali jsme expresi 30 proteinů uplatňujících se na různých úrovních regulace apoptózy pomocí real-time RT-PCR. Výsledky studie ukazují, že na základě celkové komparativní analýzy exprese těchto apoptotických regulátorů můžeme identifikovat dva TRAIL-rezistentní fenotypy odvozené z HL60 linie. Pro oba dva fenotypy jsou charakteristické upregulace a downregulace různých apoptotických genů ve srovnání s kontrolním TRAIL-senzitivním fenotypem HL60 linie. Fenotyp I se odlišoval od kontrolního TRAIL-senzitivního fenotypu upregulací signálů antiapoptotických genů BCL2, MCL1, cIAP1, cIAP2 a proapoptotických genů BID, BIM-L, BAG, BAD zatímco fenotyp II se odlišoval od kontrolního TRAIL-senzitivního fenotypu downregulací signálů TRAILu, DcR1 (decoy receptor 1), FADD a antiapoptotického genů cIAP2, upregulací signálů proapoptotických genů BID a BAD a nedetekovatelnou expresí OPG (osteoprotegerin). Tyto nové získané poznatky nám umožní lépe porozumět molekulárním mechanismům regulace apoptotického signálů na různých úrovních receptory spouštěné apoptózy.

Podpořeno: GAUK 50/04/c, IGA MZ NR8317-4 a LC06044.

VYŠETŘENÍ INAKTIVACE CHROMOSOMU X POMOCÍ METHYLAČNĚ SPECIFICKÉ PCR

Autor: Jakub Minks, 4. r., Lenka Dvořáková, Robert Dobrovolný, Martin Hřebíček

Školitel: MUDr. Ivan Šebesta, CSc., Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN

Kompenzace dvojnásobného počtu X chromosomů u žen je zajištěna náhodnou inaktivací maternálního (X_m) či paternálního (X_p) chromosomu X. Lze očekávat, že poměr aktivního X_m : X_p v populaci bude odpovídat Gaussovu rozdělení. U řady gonozomálně dědičných chorob je tíže projevů onemocnění u heterozygotek závislá na míře inaktivace zdravé alely; vzácně u nich může onemocnění probíhat stejně těžce jako u hemizygotních mužů.

Pro vyšetření je využito délkového polymorfismu v promotoru genu pro lidský androgenní receptor. DNA na inaktivním X chromosomu (X_i) je na rozdíl od aktivního (X_a) metylovaná. Po modifikaci bisulfitem se DNA izolovaná z leukocytů amplifikuje metylovačnou specifickou PCR s primery pro X_i a X_a. Vzniklé produkty jsou genotypovány. Ze zastoupení obou alel na X_i a X_a chromosomech se určí posun inaktivace.

Výsledky studie na 100 kontrolních vzorcích DNA nepotvrzují v literatuře diskutovanou závislost posunu na věku. Pět procent kontrolních vzorků vykazovalo výrazný posun (? 20:80). Vyšetřili jsme dále 16 heterozygotek pro gonozomálně dědičné choroby a jejich příbuzných. Výrazný posun jsme pozorovali u 7 žen z 5 různých rodin.

Ověřili jsme správnost metody a dosáhli vyšší přesnosti, než při použití metylovačnou senzitivních restričních endonukleas. Aplikací bisulfitové metody chceme přispět k objasnění manifestace gonozomálně dědičných nemocí u heterozygotek, vyhledat rodiny s dědičným posunem X inaktivace a pokusit se najít příčiny tohoto jevu.

Práce byla financována z grantu IGA MZNR8361-3/2005

ASOCIAČNÍ ANALÝZA TOLERANCE GLUKÓZY V NOVÉM SOUBORU REKOMBINANTNÍCH INBREDNÍCH KMENŮ POTKANA PXO

Autoři: Marie Morysová, 3. r., O. Šeda, L. Šedová, D. Křenová, F. Liška, M. Janků, L. Kazdová, T. Zima, J. Tremblay, P. Hamet, V. Křen

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

Úvod: Rekombinantní inbrední (RI) kmeny savčích modelů jsou významným nástrojem funkční a komparativní genomiky multi-faktoriálních znaků včetně obezity, hypertenze, inzulinové rezistence či dyslipidémie. V nedávno ustaveném souboru RI kmenů potkana PXO segregují alely dvou zavedených modelů metabolického syndromu – spontánně hypertenzního (SHR) a polydaktylního (PD/Cub) kmene potkana a normolipidemického a normotenzního inbredního kmene Brown Norway.

Metody: Detailní genetickou charakterizaci celé sady PXO jsme provedli pomocí PCR typizace více než 300 mikrosatelitních markerů. Dospělí samci 14 PXO kmenů (n=7-13/kmen) a progenitorů SHR-Lx (n=13) a BXH2 (n=18) byli po dobu 1 týdne krmeni dietou s vysokým obsahem sacharózy. Poté byl proveden orální glukózový toleranční test. Získaná data jsme podrobili statistické (ANOVA), asociační a vazebné analýze.

Výsledky: Genotypizací se nám podařilo významně rozšířit původní mapu na více než 700 markerů, pokrývajících rovnoměrně celý genom. Glykemický profil prokázal u mnoha parametrů signifikantní gradient mezi kmeny, nezbytný k provedení asociačních a vazebných analýz, např. u $AUC_{0-180\text{min}}$ od 203 do 606 mmol/1/180min. Asociační analýza naznačila přítomnost diskretních lokusů ovlivňujících variabilitu zkoumaných znaků (např. lačná glykémie a lokus D12Mit8, $p < 0,0001$; $AUC_{0-180\text{min}}$ a D20Mgh1, $p = 0,0006$).

Závěr: Soubor kmenů PXO představuje vhodný model pro funkční a komparativní genomiku inzulinové rezistence. Pilotní asociační analýza odhalila několik nových kandidátních lokusů pro toleranci glukózy.

ROLE RECEPTORŮ V UDRŽOVÁNÍ HOMEOSTÁZY NITROBUNĚČNÉ SIGNALIZACE V PLICÍCH

Autorka: Martina Nováková, 5. r.

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

Fyziologická funkce plic je mimo jiné i výsledkem vzájemné interakce sympatického a parasympatického autonomního nervového systému ve smyslu zajišťování homeostatické intracelulární odpovědi. V této práci jsme se zaměřili na určení úlohy jednotlivých receptorových podtypů adrenergických receptorů a muskarinových receptorů v udržování stabilní intracelulární signalizace. K tomu jsme použili následující modely: myšího kmene 129SVJ/C57Bl6 a myšího kmene, kterému byl vyřazen gen pro kortikotropin releasing hormon (CRH KO; vytvořený na stejném genetickém základě). Tyto dva kmeny jsme sledovali jednak za klidových podmínek, jednak jsme se zabývali i vlivem nesespecifické aktivace adrenergního a glukokortikoidního systému (imobilizační stres). Mimoto jsme porovnávali i rozdíly mezi pohlavími (jak v základních hladinách sledovaných parametrů, tak pod vlivem imobilizačního stresu). Sledovali jsme vazebné charakteristiky následujících podtypů adrenergických receptorů: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} (Nováková a Mysliveček, 2005), β_1 , β_2 a navíc i muskarinové receptory (Mysliveček et al., 2006). Úroveň nitrobuněčné signalizace byla sledována zjišťováním hladiny nitrobuněčného cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu).

Množství receptorových vazebných míst bylo sníženo u myši s chybějícím genem pro CRH ve srovnání s věkově odpovídajícími jedinci kontrolního kmene (WT). Největší rozdíl jsme pozorovali u podtypů α_1 -adrenergických receptorů. Stres působil hluboký pokles receptorových densit všech sledovaných receptorů u WT jedinců. Změny u CRH KO myši byly vyjádřeny v mnohem menší míře. Našli jsme změny v receptorových charakteristikách jak u WT, tak u CRH KO jedinců. Receptorová odpověď na stres byla pohlavně odlišná. Úroveň nitrobuněčné signalizace korelovala se změnami v množství receptorů.

Tyto nálezy svědčí pro význam receptorové exprese v udržování fyziologické funkce buněk jak za bazálních podmínek, tak za podmínek patologických (imobilizační stres). Zároveň jsou prvním dokladem o pohlavně závislé odlišnosti reakcí na stresovou zátěž v plicích.

1. Nováková M., Mysliveček J.: Identification of all α_1 -adrenoceptor subtypes in rat lung. *Gen. Physiol. Biophys.* 24: 349-353, 2005
2. Mysliveček J., Nováková M., Palkovits M., Křížanová O., Kvetnanský R.: Distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart. *Life Sci.* 78: 2006 (in press)

REGULATION OF RAP1GAP2/14-3-3 BINDING IS A NOVEL MECHANISM OF PROSTACYCLIN AND NITRIC OXIDE INHIBITORY FUNCTION IN HUMAN PLATELETS

Author: Pavel Říha, 5. r.

Tutor: Priv.-Doz. Dr. med. Albert Smolenski, Dipl. Biol. Meike Hoffmeister, PhD., Institute for Biochemistry II, University of Frankfurt, Medical School, Frankfurt am Main, Germany

Thrombocytes are discoid anuclear cell fragments involved in cellular mechanisms of blood clot formation. Platelet activators like ADP or thrombin cause rapid intense induction of Rap1B. Rap1B is a Ras-like small guanine-nucleotide-binding protein that controls integrin (α)IIb(β)3 activity in platelets. Recently, Rap1GAP2 was characterized as a new GTPase activating protein of Rap1B in platelets (Blood 105: 3185-3192). Rap1GAP2 diminishes Rap1B activity and thereby inhibits platelet aggregation and adhesion. Ubiquitously expressed 14-3-3 proteins modulate enzymatic activity, regulate protein localization and inhibit or mediate protein interactions.

The interaction of Rap1GAP2 and 14-3-3 was studied in transfected COS-1 cells and in platelet lysates by co-immunoprecipitations, pull-down assays and Western Blots. The Rap1GAP2/14-3-3 binding site was mapped by mutational analysis. The regulation of Rap1GAP2/14-3-3 interaction was assessed by using phosphomimetic mutants of Rap1GAP2 in transfected COS-1 cells and by activators of Rap1GAP2 phosphorylation in intact human platelets studied ex vivo. 14-3-3 beta and zeta isoforms were identified as binding partners of Rap1GAP2. The 14-3-3 binding site was mapped to N-terminal region of Rap1GAP2. The Rap1GAP2/14-3-3 binding is regulated by phosphorylation of Rap1GAP2 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases (cAK and cGK): Rap1GAP2 phosphorylation by cAK and cGK abolishes 14-3-3 binding in human platelets. Since both kinases are well-established mediators of inhibitory effects of prostacyclin (PGI2) and nitric oxide (NO) on platelet activation and aggregation, the blockade of 14-3-3 binding to Rap1GAP2 by cAK- and cGK-mediated phosphorylation represents a new mechanism of PGI2 and NO inhibitory function in human platelets.

NOVÝ KONGENNÍ MODEL METABOLICKÉHO SYNDROMU

Autoři: Štěpánka Šenkýřová, 3. r., Ondřej Šeda, Lucie Šedová, František Liška, Drahomíra Křenová, Tomáš Zima, Ludmila Kazdová, Vladimír Křen

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

Úvod: Kongenní kmeny jsou v procesu pozičního klonování stále nezbytnou součástí průkazu přítomnosti tzv. QTL v místě genomu s prokázanou vazbou s daným fenotypem. Mezi QTL pro inzulinovou rezistenci a dyslipidémii patří mj.



úsek chromozómu 20 spontánně hypertenzního kmene (SHR) potkana, inbredního modelu esenciální hypertenze a metabolického syndromu. Cílem této studie byla analýza vlivu zmíněného úseku chr.20 SHR původu na metabolické parametry a kompletace sady kongenních kmenů na genetickém pozadí inzulin-senzitivního, normolipidemického a normotenzního kmene Brown Norway (BN/Cub).

Metody: Kongenní kmen BN.SHR20 byl vytvořen přenesením úseku chromozómu 20 z kmene SHR na genetické pozadí vysoce inbredního kmene BN/Cub. Diferenciální segment u BN.SHR20 byl charakterizován pomocí sady 22 mikrosatelitních markerů. Porovnali jsme glukózovou toleranci, hladinu triacylglycerolů (TG), cholesterolu a morfometrický profil dospělých samců kmenů BN/Cub a BN.SHR20 za podmínek standardní a vysokosacharóзовé (HSD) diety. Získané výsledky byly analyzovány pomocí dvojcestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA).

Výsledky: Přenesený úsek chromozómu 20 SHR původu byl vymezen u kmene BN.SHR20 v oblasti mezi *D20Rat17* a *D20Rat2* (140Mb). Nově ustavený kmen BN.SHR20 vykázal signifikantně sníženou toleranci glukózy oproti kontrolnímu kmeni BN/Cub, její markantnější zhoršení po HSD a větší nárůst hladiny TG a současně zvýšený index adiposity ($0,91 \pm 0,01$ vs. $0,85 \pm 0,03$, $p < 0,001$).

Závěr: Ustavili jsme nový kongenní kmen BN-SHR20. Tento kmen potvrdil význam definovaného úseku chromozómu 20 u SHR pro metabolické a morfometrické aspekty metabolického syndromu.

KLASIFIKACE STUPNĚ MALIGNITY FOLIKULÁRNÍHO LYMFOMU S POUŽITÍM MARKERU KI-67

Autorka: Jana Špačková, 5. r.

Školitel: MUDr. Jan Střítecký, CSc., Ústav patologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Stanovení stupně malignity (grading) folikulárního lymfomu, maligního onemocnění postihujícího zejména lymfatické uzliny a extranodální lymfatická centra, je i v dnešní době svízelná, navzdory tomu, že existuje celá řada metod. Za neobjektivnější z nich je dnes považována Berardova metoda, založená na kvantitativním stanovení množství centroblastů v definované ploše řezu lymfatickou uzlinou. Přesná identifikace centroblastů je značně subjektivní. Naším cílem bylo pokusit se tento proces objektivizovat.

Materiál a metodika: V řezech obarvených hematoxylinem – eosinem byly vyhledány a počítány centroblasty, přesně podle původní Berardovy metody. Paralelně s nimi byl proveden imunohistochemický průkaz proliferativního markeru Ki-67. Mezi Ki-67 pozitivními buňkami byly identifikovány centroblasty a počítány. Výskyt buněk v obou skupinách byl statisticky srovnáván, samostatně pro grade I, II i III.

Výsledky: Marker Ki-67 označil všechny centroblasty, společně s dalšími proliferujícími buňkami. Počet identifikovaných Ki-67 pozitivních centroblastů pozitivně koreloval s množstvím centroblastů v standardním histologickém barvení, jejich identifikace však byla méně časově náročná a objektivnější.

Závěr: Metoda značení proliferujících buněk pomocí markeru Ki-67 výrazně sníží množství buněk, mezi kterými je třeba identifikovat centroblast. Grading folikulárního lymfomu se tak objektivizuje a usnadňuje se jeho provedení.

CHARAKTERISTIKA DYNAMIKY GENETICKÉ ARCHITEKTURY METABOLICKÉHO SYNDROMU NA ZÁKLADĚ DIFERENCIÁLNÍ VAZEBNÉ ANALÝZY

Autoři: Iva Ullmanová, 3. r., Ondřej Šeda, František Liška, Ludmila Kazdová, Lucie Šedová, Drahomíra Křenová, Květa Pelinková, Tomáš Zima, Junzheng Peng, Johanne Tremblay, Pavel Hamet, Vladimír Křen

Školitel: odb. as. MUDr. Ondřej Šeda, PhD., Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Úvod: V patogenezi metabolického syndromu se uplatňuje jednak genetická komponenta, která je výslednicí působení více genů, interagujících mezi sebou, jednak faktory vnějšího prostředí, např. dieta a medikace. Zkoumali jsme úlohu definovaného segmentu chromozómu (chr.) 4 hypertenzního kmene SHR (vneseného na genetické pozadí kmene Brown Norway (BN) u kongenního kmene BN.SHR4) v dynamice genetické architektury metabolického syndromu.

Metody: Byly vytvořeny 2 segregující F2 populace samců PDxBN ($n=149$, PD...polydaktylní kmen potkana), a PDxBN.SHR4 ($n=94$), jejichž genetický pool se liší pouze výše zmíněným úsekem chr. 4. Opakovaně jsme stanovili metabolický profil za podmínek standardní diety, sacharóзовé diety a po podání dexametazonu (>80 fenotypů). Celogenomovou charakterizací obou F2 populací jsme provedli pomocí PCR typizace 220 mikrosatelitními markery. Diferenciální vazebná analýza byla provedena intervalovým mapováním v programu MapManager (v.b20).

Výsledky: V populaci PDxBN bylo identifikováno 24 signifikantních i sugestivních QTL (lokusy kvantitativních znaků) na chr. 3, 7, 8, a 17, zatímco v populaci PDxBN.SHR4 jsme našli celkem 22 QTL převážně s lokalizací na chr. 1,8,10 a 18. Ačkoli některé jsou konkordantní pro obě populace většina vykazuje diskordanci pro sledované znaky. Závěr: Jelikož jediným genetickým rozdílem obou populací je vnesený diferenciální segment chr. 4 SHR původu, lze tento úsek považovat za podstatnou determinantu komplexní přestavby dynamické architektury metabolického syndromu.



Předávání cen vítězům 7. ročníku SVK. Děkan fakulty profesor Tomáš Zima a Mgr. Hana Kolesová. Na dolním snímku s Pavlem Kusákem.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ KLINICKÁ ČÁST

FGn
G



ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE PREGRADUÁLNÍ – KLINICKÁ ČÁST

- Bocková Lucia, 5. r.
- Dziaková Jana, 5. r.
- Feltlová Eliška, 2. r.
- Germanová Alexandra, 4. r.
- Hippmann Radek, 5. r.
- Stebel Jakub, 6. r.
- Kalužová Marie, 5. r.
- Kaniok Radek, 4. r.
- Kusák Pavel, 5. r.
- Kociánová Eva, 2. r.
- Krajíčková Jana, 4. r.
- Mášová Kristýna, 4. r.
- Pasteláková Blanka, 2. r.
- Racková Eva, 5. r.
- Wallenfelsová Eva, 5. r.
- Vnenková Eva, 5. r.
- Šulek Štěpán, 5. r.
- Špeldová Andrea, 2. r.
- Švancarová Radka, 4. r.
- Ténaiová Jana, 6. r.
- Všeticka Jan, 6. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

předseda: **prof. MUDr. Zdeněk Broukal, CSc.**

člen: doc. MUDr. Richard Češka, CSc.



CHŘIPKA-BANÁLNÍ VIRÓZA NEBO VÁŽNÁ HROZBA?

Autorky: Lucia Bocková, 5. r., Jana Dziaková, 5. r.

Školitelka: MUDr. Miriam Schejbalová, Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF UK a VFN

Chřipka je dnes již opakovaně diskutovaným tématem. Pravidelný nárůst nemocnosti je zátěží pro zdravotnická zařízení ekonomiku státu. Známe i pár příkladů z dějin, kdy velké pandemie značně snížily počty obyvatel ve velké části světa. Mnoho lidí vnímá chřipku jako respirační virózu, nemoc spíše nepříjemnou než závažnou, a takřka nezbytnou součást zimního období. Ačkoliv existuje dostupná a účinná prevence - očkování, proočkovanosť v ČR je nízká. Je to důsledek bagatelizování problému, neinformovanosti nebo jde o důvody finanční? Tuto i jiné otázky ohledně prevence chřipky zkoumá předložená práce. Výzkum byl zaměřen na populaci studentů VŠ, šetření proběhlo formou dotazníků. Výsledky jsme zpracovaly do tabulek a grafů. Součástí práce je i metaanalýza několika dalších epidemiologických šetření. Z odpovědí studentů vyplývá, že jejich informovanost o chřipce je dobrá a proočkovanosť ve vzorku převyšuje celostátní průměr. Protože je dnes aktuální problematika ptačí chřipky, věnovaly jsme pozornost i této otázce. Studenti mají informace o této nemoci a vědí o možnosti jejího přenosu na člověka. Jen desetina dotazovaných uvádí, že stát má dost prostředků k zabránění pandemie, pouze polovina se ale případné pandemie obává. Většina světových odborníků se domnívá, že do několika let lze s prakticky stoprocentní jistotou očekávat další pandemii chřipky. Kdy a kde udeří, neví nikdo. Je ale možné, že bude brzo u popředí světových fór otázka: Vyhubí lidstvo chřipka nebo AIDS?

ZASTAVENÍ PRACOVNÍCH MODELŮ DO ARTIKULÁTORU V PRŮMĚRNÝCH HODNOTÁCH A POMOCÍ INDIVIDUÁLNÍHO NASTAVENÍ MECHANICKÝM A ELEKTRONICKÝM OBLIČEJOVÝM OBLOUKEM

Autorka: Eliška Feltlová, 2. r.

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

Úvod: V dnešní době je nejběžnějším stanovením polohy horní a dolní čelisti vzhledem k poloze temporomandibulárního kloubu pomocí obličejového oblouku. Obličejový oblouk se dá stanovit jak mechanickým přenosem, tak přesnějším a modernějším elektronickým přenosem. Tyto metody se mohou použít i pro rekonstrukci mezičelistních vztahů při zhotovení celkové snímatelné náhrady, pro stanovení kloubní dráhy a to jak fyziologické, tak patologické. Cílem sdělení je porovnat jednotlivé metody při zastavení pracovních modelů do artikulátoru s ohledem na individualizaci přenosu anatomických hodnot obličeje a průběhu a sklonu kloubní dráhy.

Metodika: U vybrané pacientky, která má patologické diskopatii temporomandibulárního kloubu, jsme přenesli anatomické hodnoty a nastavení kloubních drah pomocí mechanického obličejového oblouku. Pomocí speciálních pomůcek jako je kovová lžice, ramena oblouku a silikonové otiskovací hmoty došlo k přenesení anatomických hodnot pacientky do artikulátoru a k zastavení pracovních modelů. Druhá metoda využila elektronický přenos obličejovým obloukem. Pomocí počítače jsme analyzovaly hodnoty podélného a příčného sklonu kloubní dráhy, Bennettův úhel a pohyb a hodnoty pro nastavení řezákového a špičkového vedení. Měření jsme opakovali celkem čtyřikrát. Z těchto měření jsme vybrali hodnoty, které se sobě nejlépe podobaly a podle nich jsme nastavili hodnoty na artikulátoru a zastavili pracovní model.

Výsledky: Elektronický záznam přesně rozlišuje hodnoty anatomické a funkční, umožňuje individuální nastavení polohy pracovních modelů, výhodná je i rychlost přenosu údajů. Individuální nastavení je vždy spojeno s rozptylem měřených hodnot, který však není statisticky významný.

Závěr: Formou kasuistických sdělení jsme zanařenovali rozdíly při použití plně seřiditelného artikulátoru při přenosu v průměrných hodnotách, při přenosu mechanickým obličejovým obloukem za pomoci nastavení tomogramu temporomandibulárních kloubů a počítačovým obličejovým obloukem s naprostou individualizací přenosu mezičelistních vztahů včetně konkrétních hodnot kloubní dráhy. Příspěvek zhodnotí všechny tři metody porovnáním dosažených hodnot u jednoho konkrétního pacienta.

POLYMORFISMY GENU PRO GLYOXALASU I U HEMODIALYZOVANÝCH PACIENTŮ

Autorka: Alexandra Germanová, 4. r., PŘF UK

Školitelka: doc. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Konzultantka: RNDr. Marie Jáchymová, Ph.D, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Produkty pokročilé glykace (AGEs) se spoluúčastní v patogenezi řady chronických onemocnění, např. diabetes mellitus, kardiovaskulárních onemocnění, chronického selhání ledvin a neurodegenerativního onemocnění. AGEs mohou přímo poškodit strukturu extracelulární matrix, změnit její fyzikální a chemické vlastnosti a po interakci s RAGE (receptorem pro AGEs) indukují prozánětlivou odpověď. AGEs vznikají neenzymatickou glykací a vlivem oxidačního a karbonylového stresu. Jejich prekursory, reaktivní karbonylové sloučeniny, mohou být enzymaticky detoxifikovány prostřednictvím specifických reduktas, např. glyoxalasy I. Cílem práce bylo studium polymorfismů tohoto enzymu.

Metodika: Sledovanou skupinou je 235 pacientů s chronickým selháním ledvin léčených hemodialýzou a 90 kontrol. Polymorfismus A111E (419A/C) na 4. exonu genu pro glyoxylasu I byl vyšetřen metodou založenou na principu RFLP (restriction fragment length polymorphism) s následnou vizualizací elektroforézou na agarozovém gelu.

Výsledky: Nenalezli jsme signifikantní rozdíl v genotypových a alelických frekvencích polymorfismu A111E genu pro glyoxalasu I u dialyzovaných pacientů a kontrol (genotypy: $\chi^2 = 0.048$, $p = 0.9$; alely: $\chi^2 = 0.004$, $p = 0.9$).

Závěr: První výsledky ukazují, že polymorfismus A111E genu pro glyoxalasu I u hemodialyzovaných pacientů se neliší od běžné populace. Je předmětem dalšího studia, zda genetické markery souvisí s klinickým stavem pacientů a výsledky dalších laboratorních vyšetření.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO - 0 64165.

SANACE DEFEKTŮ CHRUPU HYBRIDNÍ NÁHRADOU – POROVNÁNÍ DVOU TYPŮ KOTVENÍ

Autoři: Radek Hippmann, 5. r., Jakub Stebel, 6. r.

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

Úvod: Hybridní náhrady jsou zvláštní typy rozsáhlých snímatelných náhrad kotvených na radixy přirozených zubů nebo na implantáty. Výhodou těchto náhrad je dobrá stabilita a pomalejší resorbce kosti alveolárního výběžku. Cílem naší studie bylo subjektivní i objektivní porovnání kvality sanace kotvením na radixy zubů proti kotvení na implantáty.

Materiál a metoda: Do naší studie bylo zahrnuto celkem 35 pacientů. Z tohoto počtu bylo 18 náhrad kotvených na implantáty a 19 s využitím kořenů. Subjektivně pacienti zhodnotili náhrady pomocí dotazníku s kategoriemi: dřívějších zkušeností, případné porovnání náhrad, celková spokojenost, estetika, problémy s návykem, retence a případné doporučení tohoto ošetření. Poté byli pacienti vyšetřeni klinicky a doplněna krátká anamnéza. Hodnocena byla dle daného dotazníku stabilita, retence, atd. Získané údaje jsme zpracovali a statisticky porovnali obě skupiny.

Výsledky: Při subjektivním hodnocení náhrad byla většina pacientů celkově spokojena se svou náhradou. Retence byla ve většině případů hodnocena jako výborná až dobrá, jen ve 4 případech nevyhovující. Estetika byla výborná až dobrá a ve 3 případech vyhovující. S přivyknutím nebyly zjištěny problémy. Jen 1 pacient by tento typ sanace nedoporučil. Jediný signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami byl v předchozím užívání snímatelné náhrady. U klasických hybridních náhrad mělo 44,4% předchozí zkušenost proti 88,9% u náhrad na implantátech. Objektivně nebyl rozdíl mezi oběma skupinami v retenci a stabilitě.

Diskuse a závěry: Sanace pomocí hybridní náhrady je subjektivně i objektivně vhodná. Rozdíl mezi kvalitou při použití radixů zubů nebo implantátů jsme nezjistili.

HYDROCEPHALUS U DĚTÍ S DIAGNOSOU NEROFIBROMATOSIS VON RECKLINGHAUSEN TYP 1

Autorka: Marie Kalužová, 5. r.

Školitel: MUDr. Bořivoj Petrák, CSc., Klinika dětské neurologie UK 2. LF a FN Motol

Úvod: Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1 (NF 1) je onemocnění patřící mezi neurokutánní syndromy. Incidence v populaci je 1 : 3000 – 4000. Gen pro NF 1 je lokalizován na 17. chromozomu, má charakter tumor – suppressor genu a jeho produktem je neurofibromin. Mezi klinické nálezy u NF 1 patří také hydrocephalus.

Cílem předkládané studie je zhodnotit výskyt hydrocephalu a jeho etiologii u dětí s diagnosou NF 1.

Metodika: Je hodnocena skupina 229 pacientů se základní dg. NF1. Podmínkou po zařazení do této skupiny bylo zobrazovací vyšetření mozku - MRI, vzácně CT mozku. V souboru je 123 chlapců (54 %) a 106 dívek (46 %). Věk pacientů je od 7 měsíců do 21 let 6 měs. věku. Všichni pacienti byli vyšetřeni v Ambulanci pro neurokutánní syndromy polikliniky FN Motol, případně na Klinice dětské neurologie UK 2. LF a FN Motol.

Výsledky: Hydrocephalus se vyskytl u 20/229 (9 %) pacientů s NF 1. Ve 14 (6 %) případech byl způsoben nádorem mozku nebo arachnoidální cystou. U 6 (3 %) dětí šlo o vzácnou stenozu distální části aqueductu (bez přítomnosti expansivního procesu, krvácení nebo zánětu v anamnéze), z toho u 2 dětí se stenosa mokovodu rozvinula během sledování. Procesy charakteru gliomu se podílely na rozvoji hydrocephalu v 10/20 (50 %) případech. V 6/20 (30 %) byl hydrocephalus způsoben nádorovým procesem (gliomem) lokalizovaným jinde než v oblasti optického chiasmatu a optiků, u 4/20 (20 %) při gliomu chiasmatu. U 2/20 (10 %) šlo o expansivně se chovající arachnoidální cystu, a u 2/20 (10 %) v důsledku expansivně se chovajícího plexiformního neurofibromu.

Závěr: Diagnosa NF 1 je v dětském věku spojena s rizikem výskytu hydrocephalu u 9 % pacientů. Rozvoj hydrocephalu je potřeba zahrnout do klinického obrazu diagnosy NF 1. Nejčastější příčinou rozvoje hydrocephalu byly nádorové procesy charakteru gliomu, a to převážně mimo optickou dráhu. Hydrocephalus se může u NF 1 rozvinout v průběhu života i bez přítomnosti expanse – při pomalu progredující stenozě distální části mokovodu. Možnost rozvoje stenosis mokovodu je jedním z důvodů indikace kontrolního zobrazení v průběhu života pacienta s NF 1.

Podporováno : výzkumným záměrem MZ ČR 0000064203, VZ KDN FNM č. 6051



FLUID TREATMENT – THE MAIN TOPIC IN THERAPY OF PATIENTS WITH ADULT RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Author : Radek Kaniok, 4. r.

Tutors: Vladimír Černý, assoc. prof., M.D., Ph.D., FCCM, Pavel Dostál, M.D., Ph.D., Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Charles University in Prague, Medical Faculty in Hradec Králové, University Hospital in Hradec Králové

Introduction: Fluid therapy plays an important role in the support of cardiovascular function and organ oxygen supply. In critically sic patiens, the positive fluid balance is associated with formation of edemas and may adversely affect pulmonary functions. The aim of project was to review a cumulative 7 day fluid balance in relation to mortality and morbidity of patients with ARDS treated in an intensive care unit.

Material & Methods: These parameters were evaluated: – age, sex, type of admission, APACHE II score, SOFA score, paO_2/FIO_2 ratio, fluid balance on the day 7, use of elimination techniques, duration of mechanical lung ventilation, duration of hospitalization, survival Retrospective observational study in patients with ARDS hospitalized in the years 2001-2005. For statistical analysis, MedCalc version 8.0 statistical package was used .

Results: Following data was obtained: mean age 52 years, mean APACHE II score 24, entry SOFA score 10, type of ARDS – pulmonary in 22 patients, extrapulmonary in 45 patients, mean paO_2/FIO_2 ratio at admission 173, mean value of 7 day liquid balance +2875 ml, mean length of stay in ICU 13.6 days, duration of artificial lung ventilation 11 days. Only a part of the study results will be presented. Sixty seven patients were included into the study. Forty eight patients survived, 19 patients died (mortality 21%). Cumulative fluid balance 7 days after admission was significantly higher in patients who died than in the survivors (6295 ml vs. 1618 ml, $p = 0,01$).

Discussion & conclusion: It exists relation between fluid balance and oxygenative lung function and also duration of artificial lung ventilation but sensitivity ratio of determination of liquid balance is relatively low. Higher positivity of fluid balance is associated with a worse clinical outcome in patients with ARDS. Value of fluid balance in 3rd day of hospitalization has the same predictive value as SOFA score and APACHE II score at admission.

ÚROVEŇ ENDODONTICKÉHO OŠETŘENÍ OBYVATEL ČESKÉ REPUBLIKY A JEHO VLIV NA ONEMOCNĚNÍ PERAPIKÁLNÍCH TKÁNÍ

Autor: Pavel Kusák, 5. r.

Školitel: odb. as. MUDr. Luděk Peřinka, CSc., Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Na 200 ortopantomogramech náhodně vybraných pacientů stomatologické kliniky, zachycující obě ozubené čelisti, autor analyzuje úroveň endodontického ošetření. Endodonticky ošetřené zuby jsou rozděleny do skupin podle kvality ošetření (lege artis, krátká kořenová výplň, dlouhá k.v.). U všech skupin je navíc sledována periapikální oblast s ohledem na kvalitu lamina corticalis, jejíž poškození signalizuje zánět v oblasti hrotu kořene.

Výsledky: Z celkem 4981 analyzovaných zubů jich bylo endodonticky ošetřeno 360 (7,2 %). Z 360 endod. ošetřených zubů bylo lege artis ošetřeno pouze 49 (13,6 %), přičemž s periapikálním nálezem bylo diagnostikováno 187 zubů (51,9 %) ze všech endodonticky ošetřených.

Závěrem studie je rozbor možných příčin a porovnání získaných údajů s podobnými studiemi v zahraničí.

ZUBNÍ KŘÍŽ

Autorka: Eva Kociánová, 2. r.

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

Úvod: Elektronický záznam stavu dutiny ústní umožňuje snadnou grafickou informaci pro lékaře, lze ho využít i k identifikaci osob či pro komunikaci při předávání statistických údajů. Pro potřeby státní zprávy či zdravotních pojišťoven. Stomatologové shromažďují údaje do různých databází a často využívají např. MS Access database nebo MS Excel Sheets. Tyto systémy obsahují mnoho volného nestrukturovaného textu, který nelze dále zpracovat. Elektronický strukturovaný záznam v grafické podobě má výhodu, že je stručný a věcný. Cílem studie je aplikovat grafický zubní kříž při analýze stavu chrupu studentů stomatologie.

Metodika: Vybrali jsme celkem 10 studentů. Zhotovili jsme makrofotografie dutiny ústní, provedli jsme rtg vyšetření – ortopantomogramy, studenty jsme vyšetřili a nalezené informace jsme zaznamenali do elektronického zubního kříže (strukturovaný elektronický záznam) – zaznamenali jsme počet a rozčlenění zubů v zubním oblouku, extrakce, přítomnost kazů (rozsah) a výplní (rozsah a materiál), endodontické ošetření, přítomnost fixních a snímatelných náhrad (korunky, můstky apod.), nesprávné prořezávání zubů, ortodontické anomálie jako jsou například obrácený a zkřížený skus. Poté jsme vyjádřili počet kazů, výplní a extrakcí pomocí indexu kazivosti KPE. Všechny hodnoty a nasnímané obrázky jsme ukládali do databáze vybraných pacientů. Výsledky jsme pak porovnávali mezi vybranými pacienty.

Výsledky: Soubor byl nehomogenní, náhodným výběrem jsme zavzali studenty jak s intaktním chrupem, tak s velmi destruovaným. Z 10 pacientů jsme u dvou zjistili, že nedošlo k založení jednoho stálého třetího moláru. Věkový průměr vybraných pacientů je 24,3 let na osobu. Nejistili jsme žádné výrazné dentální anomálie, jen drobné komprese. U poloviny

vybraných pacientů probíhá nebo proběhla ortodontická léčba. Celkový index kazivosti stálého chrupu KPE u vyšetřovaných pacientů vyšel 27, 2 %.

Závěr: Elektronický zubní kříž v grafické podobě optimálně dokumentuje stav i průběh ošetření, má atributy teoreticko-poznávací i ryze praktické. Prokázali jsme, že elektronický zubní kříž můžeme využít záznam stavu chrupu, ale i nejen pro stanovení různých indexů používaných v klinické praxi.

TUKOVÁ TKÁŇ A SYSTÉMOVÝ ZÁNĚT U PACIENTŮ S RENÁLNÍM SELHÁNÍM

Autoři: J. Krajičková, 4. r., M. Dolinková, Z. Lacinová, M. Haluzík

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

Úvod: U pacientů s chronickým renálním selháním léčeným hemodialýzou (RS) je přítomná chronická zánětlivá reakce podílející se na zhoršení prognózy i rozvoji kardiovaskulárních komplikací. Cílem této studie bylo zjistit, zda je tuková tkáň signifikantním zdrojem prozánětlivých faktorů u těchto nemocných.

Metodika: 17 pacientkám s RS a 12 štíhlým zdravým ženám (K) byla na před začátkem operace (RS – transplantace ledviny, K - cholecystektomie) odebrána krev a na počátku operace vzorek podkožní a viscerální tukové tkáně. Sérové koncentrace leptinu, adiponektinu a resistinu byly stanoveny metodou ELISA a genové exprese leptinu, adiponektinu, resistinu, adiponektinových receptorů 1 a 2, IL-6, TNF- α a MCP-1 metodou real-time PCR.

Výsledky: Sérové koncentrace leptinu byly signifikantně zvýšené u pacientek s RS oproti kontrolní skupině, ale exprese leptinu se významně nezměnila. Hladina adiponektinu v séru, jeho genová exprese, ani exprese adiponektinových receptorů nebyly onemocněním ovlivněny. U pacientek s RS byla významně zvýšená sérová hladina i exprese resistinu v podkožní i viscerální tukové tkáni. Došlo také k signifikantnímu vzestupu genové exprese TNF- α , IL-6, MCP-1.

Závěr: Tuková tkáň se významně podílí na systémovém zánětu pacientů s RS produkcí prozánětlivých cytokinů.

PROTILÁTKY PROTI FOSFATIDYLETHANOLAMINU (APE) U PACIENTŮ S TROMBÓZAMI

Autorka: Kristýna Mášová, 4. r.

Školitelé: prof. MUDr. Terezie Fučíková DrSc., přjm. RNDr. Ivana Janatová, MUDr. Karin Malíčková, Klinická imunologie a alergologie – laboratoř, Ústav klinické biologie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN

Úvod: Trombóza je onemocnění postihující tepennou či žilní část cévního systému v jakékoli lokalitě, které vzniká kompletním či parciálním uzavěrem cévy trombem. Mezi hlavní patogenetické mechanismy trombózy patří alterace krevního toku, změna koagulace krve (hyperkoagulace) a poškození cévní stěny. aPE, jakožto jedny z antifosfolipidových protilátek (APLA), mohou být jednou z příčin trombofilních stavů nejspíše prostřednictvím svého vlivu na trombocyty, endotel, antitrombin III, inhibitory hemostázy či urychlením procesu aterosklerózy. APLA se neváží k fosfolipidům přímo, ale prostřednictvím plazmatických vazebných proteinů (kofaktorů), ke kterým patří β 2GP1, protrombin, annexin V nebo HMWK, LMWK a HMWK-vazebné proteiny, f XI, prekallikrein v případě protilátek proti fosfatidylethanolaminu. K rutinně stanovovaným APLA při trombózách vzniklých na autoimunitním podkladě patří protilátky proti fosfatidylserinu (aPS), β 2GP1 (a β 2GP1), kardiolipinu (aCL). aEA bylo dosud věnováno málo pozornosti, a proto bylo cílem mé práce zjistit, zda jsou i tyto protilátky asociovány s trombózami.

Metodika: Vyšetřila jsem 6 sér pacientů s trombotickými příhodami v anamnéze a 34 bez nich na přítomnost aPE, aPS, a β 2GP1 a aCL ve třídě IgG a IgM. Ke stanovení uvedených protilátek jsem použila metodu ELISA (diagnostická souprava AESKULISA Ethanolamine-GM, Německo).

Výsledky: Oproti pacientům bez manifestních trombóz jsem u pacientů s trombózami našla statisticky významně zvýšené hladiny aPE (pro IgG $p=0,05$, pro IgM $p=0,02$), stejně tak hladiny aPS (pro IgG $p=0,05$, pro IgM $p=0,02$) a a β 2GP1 (pro IgG $p=0,03$, pro IgM $p=0,02$). Hladiny aCL (pro IgG $p=0,06$, pro IgM $p=0,07$) nebyly ve skupinách pacientů s /bez trombóz významně statisticky odlišné.

Závěr: Vzhledem k tomu, že protilátky proti fosfatidylethanolaminu byly ve třídě IgG i IgM statisticky významně asociovány s trombózami, doporučuji také je zahrnout do skupiny rutinně vyšetřovaných APLA při podezření na trombózy autoimunitní patogeneze.

ZUBNÍ KŘÍŽ

Autorka: Blanka Pasteláková, 2. r.

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

Úvod: Elektronický grafický zubní kříž shromažďuje a zaznamenává skutečnosti v reálné dutině ústní pacienta. Umožňuje sledovat a porovnávat časové změny v této lokalitě a zároveň z něho lze usuzovat na budoucí vývoj dané oblasti a tím například volbu vhodného protetického řešení.

Metodika: Vybrali jsme celkem 12 pacientů s různým typem ošetření. Pacienty jsme vyšetřili, zhotovili jsme fotografickou a rentgenologickou dokumentaci. Zjištěné údaje jsme zaznamenali do elektronického zubního kříže (strukturovaný elektronický záznam) – počet a rozdělení zubů v zubním oblouku, extrakce, přítomnost (rozsah) kazů a výplní (rozsah i materiál), endodontické ošetření, přítomnost fixních a snímatelných náhrad (korunky, můstky apod.), ortodon-



tické anomálie. Všechny hodnoty a nasnímané obrázky jsme ukládali do databází jednotlivých pacientů. Výsledky mezi jednotlivými pacienty jsme porovnali. Hodnotili jsme tedy pacienty s intaktním chrupem, chrupem klasicky ošetřeným, ortodonticky ošetřeným chrupem, chrupem s fixní či snímatelnou náhradou a implantáty.

Výsledky: Při výběru pacientů jsme snažili o co možná nejširší škálu stavu chrupu. Výsledkem bylo tedy porovnávání jednotlivců různého věku i pohlaví. Mladší pacienti měli chrup intaktní, klasicky ošetřený, či opatřený ortodontickým aparátem. Rozsahy kazů a výplní byly přiměřené jejich věku a extrakce se týkaly ortodontických řešení či zdravotních potíží. U pacientů vyššího věku jsme zaznamenali přítomnost fixních či snímatelných náhrad kotvených na vlastních zubech nebo implantátech vzhledem ke ztrátě většího počtu vlastních zubů. Na rozdíl od mladých jedinců jsme u nich stanovili rozsáhlejší zásahy a jejich větší množství ze stany lékaře, odhalené krčkové oblasti v důsledku věku pacientů případně parodontózy.

Závěr: Stav chrupu jednotlivých pacientů se podle předpokladu lišil jen částečně v závislosti na jejich věku, vůbec však na jejich pohlaví. Analýza výsledků prokázala, že elektronický zubní kříž může být použit k identifikaci osob, k registraci průběhu terapie i pro ozřejmení stavu při běžném klinickém vyšetření bez RTG málo zřejmých. Jedná se především o zuby nezaložené, neprořezané či např. implantáty.

PROBLEMATIKA KOUŘENÍ NA PRAŽSKÝCH ZÁKLADNÍCH ŠKOLÁCH

Autorky: Eva Racková, 5. r., Eva Vnenková, 5. r., Eva Wallenfelsová, 5. r.

Školitelka: MUDr. Eva Králíková, CSc., Ústav epidemiologie a Centrum léčby závislosti na tabáku 1. LF UK a VFN

Úvod: Většina kuřáků (90 %) začíná kouřit během dětství a dospívání. Marketing tabákových výrobků je proto zaměřen právě na tuto věkovou skupinu. Cílem našich seminářů je interaktivně informovat o dopadech kouření na organismus a faktech týkajících se tabákového průmyslu.

Metodika: Hlavní náplní naší práce byl seminář zaměřený na prevenci kouření na základních školách na Praze 7 a Praze 2. Vycházeli jsme z britského programu QUIT Primary School. Data jsme získávali dotazníkovým šetřením.

Výsledky: Předběžné výsledky naší práce jsou následující: 45 % dětí z našeho souboru (N = 279, z toho dívek 158 a chlapců 121) ve věku od 10 do 15 let má zkušenost s cigaretou. Průměrný věk užití první cigarety je 10 let, medián 11 let.

Závěr: Nikotinismus u dětí je závažným problémem, závislost vzniká rychleji a již po relativně malém počtu vykouřených cigaret. Až polovina dětí, které cigaretu vyzkouší, začne pravidelně kouřit. Dle našich výsledků by bylo vhodné začínat s preventivními programy již u dětí od 8 let věku.

PILOTNÍ STUDIE POUŽITÍ MANUÁLU DROGOVÉ PREVENCE U HOSPITALIZOVANÝCH ADOLESCENTŮ

Autoři: Štěpán Sulek, 5. r., Kateřina Vacková

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

Užívání návykových látek patří do syndromu rizikového chování a podle studie ESPAD u nás stoupá. Souvisí s nejčastějšími příčinami mortality adolescentů, kam patří dopravní nehody, otravy a sebevraždy. Cílem naší studie bylo otestovat nový Manuál drogové prevence pro praktické lékaře pro děti a dorost (PLDD) jako screeningovou metodu pro rozpoznání užívání návykových látek se třemi dotazníky: obecná psychosociální adaptace, dotazník na přítomnost závislosti MKN – 10 a překlad anglického dotazníku CRAFFT. Během 5 měsíců jsme oslovili 53 hospitalizovaných dospívajících (13 chlapců, 40 dívek, věk 15,7 ± 1,6). Všichni podepsali informovaný souhlas, že budou vypovídat pravdivě. Soubor jsme rozdělili podle několika kritérií a porovnali dotazníky CRAFFT a MKN-10. Zkušenost s alkoholem referovalo 90,5 %, s marihuanou 35,8 %, s dalšími ilegálními drogami 7,5 %. CRAFFT zachytil užívání návykových látek lépe než MKN – 10 u dospívajících se zkušeností s tabákem ($p < 0,00001$ vs. $p < 0,001$), a to i mezi současnými a bývalými kuřáky v intervalu posledních 30 dnů ($p < 0,001$ vs. $p < 0,05$), s alkoholem ($p < 0,00001$ vs. $p < 0,01$) i s marihuanou ($p < 0,0001$ vs. $p < 0,001$). Více kladných odpovědí v CRAFFT mají dospívající starší 15 let ($p = 0,057$), dospívající s horším školním prospěchem ($p=0,059$) a nezáporným názorem na drogy ($p < 0,05$). Všichni dospívající se zkušenostmi s marihuanou mají předchozí zkušenost s tabákem ($p < 0,001$). Nenašli jsme signifikantní rozdíly v žádném ze sledovaných parametrů v závislosti na pohlaví. Manuál drogové prevence je vhodnou screeningovou metodou pro PLDD.

POLYMORFISMY GENŮ PRO ADIPONECTIN A RESISTIN U PACIENTEK S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ A OBEZITOU - PILOTNÍ STUDIE

Autoři: Štěpán Sulek, 5. r., M. Dolinková, Z. Lacinová, J. Křížová

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

Adiponectin a resistin jsou adipocytární hormony, které se mohou podílet na vzniku obezity a inzulínové rezistence. Jejich geny představují nové kandidátní geny zodpovědné za inzulínovou rezistenci a diabetes mellitus 2. typu. Cílem studie bylo stanovit četnost jednonukleotidových polymorfismů 45T>G a 276T>G adiponectinového genu a 62G>A a -180C>G resistinového genu u patientek s obezitou, mentální anorexií a u kontrolní skupiny štíhlých žen a porovnat vliv jednotlivých genotypů na koncentrace sledovaných hormonů.

Stanovili jsme sérové hladiny adiponektinu, resistinu, TNF-alfa a inzulinu a provedli DNA analýzu u 17 mentálních anorektiček, 51 obézních a 17 štíhlých žen. Polymorfismy jsme detekovali polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s následnou restriční analýzou PCR produktu. Koncentrace adiponektinu byly nejnižší u obézních a nejvyšší u mentálních anorektiček. Hladiny resistinu byly nejnižší u mentálních anorektiček a nejvyšší u obézních. Při rozdělení probandů uvnitř skupiny podle genotypů jednotlivých polymorfismů nebyly zjištěny rozdíly ve sledovaných parametrech. Pouze u kontrolní skupiny byl Body Mass Index (BMI) významně vyšší u G/G genotypu než u nosičů alely T v pozici 276 adiponektinového genu ($23,48 \pm 0,85$ vs. $19,7 \pm 0,95$, $p < 0,05$). U mentálních anorektiček byla vyšší frekvence alely G u polymorfismu RETN-180 ve srovnání s kontrolami ($p < 0,04$). Naše pilotní studie neprokázala vliv sledovaných polymorfismů na hladiny adipocytárních hormonů.

PRVNÍ POMOC PRO VEŘEJNOST – PŘEDSTAVENÍ PROJEKTU

Autorky: Andrea Špeldová, 2. r. M. Ingrischová, MUDr. B. Jindrová

Školitel: MUDr. Václav Vávra, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. LF a VFN (dále jen KARIM)

Úvod: Správné poskytování laické první pomoci v prvních minutách postižení má rozhodující vliv na přežití poškozených, (zejména posthypoxické prokrvení tkání, hlavně CNS). S cílem zlepšit znalosti záchranných postupů u veřejnosti a středoškolských studentů, probíhá od roku 2004 projekt výuky technik první pomoci. Tento osvědčený program uskutečňuje 11 studentů 1. LF UK (II.–V. roč.) a mladí lékaři pod záštitou KARIM 1. LF UK a VFN, zastoupené as. MUDr. Václavem Vávrou.

Metodika: 11 studentů 1. LF UK a mladí lékaři od roku 2004 proškolili 997 účastníků. Školení probíhá 2–3x do měsíce v Akademickém klubu nebo v sídlech soukromých firem. Kurz trvá 2 hodiny, jeho součástí je teoretická hodina a praktický nácvik život zachraňujících úkonů.

Výsledky: Účastníci kurzů oceňují, že jsou jim přednášeny nejnovější poznatky, které si mohou v praktické části přímo sami vyzkoušet. Zároveň mohou pokládat školitelům dotazy, které je zajímají. Setkáváme se s kladným ohlasem, protože jim získané znalosti umožňují se rychle rozhodovat při poskytování první pomoci.

Závěr: V roce 2006 bychom rádi oslovili s nabídkou proškolení 1. pomoci i mimopražské oblasti. Vešli jsme v jednání i s pojišťovnou Generali, abychom v rámci jejich akcí proškolili jak mládež, tak i dospělé. Je skutečností, že absolventi kurzů při setkání s poraněnými neváhají a díky získaným znalostem dokáží fundovaně pomoci do příjezdu lékaře.

PROTILÁTKY PROTI ANNEXINU V JAKO RIZIKOVÝ FAKTOR OPAKOVANÝCH SPONTÁNNÍCH POTRATŮ

Autorka: Radka Švancarová, 4. r.

Školitelé: prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc., prim. RNDr. Ivana Janatová, MUDr. Karin Malíčková, Klinická imunologie a alergologie – laboratoř, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Annexin V, izolovaný v polovině osmdesátých let z lidské krve pupečnickových arterií a z placent, je účinným inhibitorem na fosfolipidech závislých koagulačních reakcí. Tento kalcium dependentní protein působí jako kompetitivní inhibitor při vazbě koagulačních faktorů na fosfatidylserin exprimovaný na vnější vrstvě membrány syncytiotrofoblastu. Formuje jakýsi antitrombotický štít kolem negativně nabitého fosfatidylserinu a hraje tak zřejmě významnou roli při udržování normální funkce placenty. Protilátky proti annexinu V (AVAb) jsou proto spojovány se vznikem placentárních trofobóz, apoptózou syncytiotrofoblastu a snížením sekrece hCG. Cílem mé práce bylo zjistit prevalenci sérových AVAb a jejich vztah k reprodukčnímu selhání u pacientek s/bez historie spontánních potratů v anamnéze.

Metodika: Vyšetřila jsem séra 6 pacientek s anamnézou jednoho nebo více spontánních potratů, které netrpí autoimunitní ani tromboembolickou chorobou; séra 7 pacientek s anamnézou jednoho nebo více spontánních potratů a autoimunitní nebo tromboembolickou chorobou; séra 13 pacientek s diagnózou neplodnost, bez spontánního potratu v anamnéze; a séra 9 pacientek se SLE a/nebo APS a žádným selháním reprodukce v anamnéze. Hlavním kritériem analýzy byla přítomnost/nepřítomnost spontánních potratů. Pacientky byly proto rozděleny na 2 skupiny – potrácející/nepotrácející – s cílem zjistit, zda se od sebe ve výskytu protilátek liší. K detekci AVAb byla použita ELISA metoda. V těchto sérech byly kromě IgG a IgM protilátek proti annexinu stanoveny také protilátky proti kardiolipinu, fosfatidylserinu a etanolaminu.

Výsledky: Séra pacientek se spontánními potraty vykazovala signifikantně vyšší hladiny AVAb v třídě IgG v porovnání se séry pacientek bez potratů ($p = 0,005$). Hladiny AVAb v třídě IgM, protilátek proti kardiolipinu, fosfatidylserinu a etanolaminu se v jednotlivých skupinách pacientek významně nelišily.

Závěr: Na základě výsledků mé práce se zdá, že anti-annexinové protilátky by mohly být lepším prediktorem opakovaných spontánních potratů než dosud vyšetřované protilátky proti kardiolipinu. Vzniká zde ale otázka, zda by protilátky proti annexinu V nemohly být pouze následkem opakovaných potratů. Tento problém by proto vyžadoval další zkoumání.



VÝSKYT HIÁTOVÉ HERNIE V BĚŽNÉ ENDOSKOPICKÉ PRAXI

Autoři: J. Těnaiová, 6. r., K. Lukáš, K. Hrubant, R. Brůha, A. Novotný, J. Petrtyl, V. Jirásek, T. Švestka, P. Urbánek, L. Tůma

Školitel: prim. MUDr. Karel Lukáš, CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF a VFN a Gastroenterologické centrum VFN

Hiátová hernie (HH) je častým nálezem při endoskopii horní části trávicího traktu. Přesto údaje o incidenci a prevalenci HH v populaci jsou nedostačující. Samotná HH je asymptomatická a projevuje se komplikací. Obvykle se jedná o příznaky refluxní choroby jícnu, jako je pyróza, noční reflux, pálení za sternem a anémie. Výskyt HH u endoskopovaných pacientů je v literatuře udáván kolem 20 %. HH je definována jako přemístění distálního jícnu a části žaludku jícnovým hiátem do mediastina. Obvykle je získaným stavem, vzniká oslabením fixace gastroezofageální junkce, vytažením žaludku při krátkém jícnu či vytlačení žaludku zvýšeným intraabdominálním tlakem. Rizikovými faktory pro vznik HH jsou proto: ochablost pojiva ve stáří, zvracení, kašel, chronická traumata, tlačení na stolici, obezita, ascites, těhotenství. Význam HH spočívá v oslabení antirefluxních mechanismů bránice, zmenšení délky i tlaku dolního jícnového svěrače a zadržení refluxátu ve vaku hernie, čímž je zvýšena expozice jícnové sliznice kyselinou. HH je jedním z rizikových faktorů pro vznik refluxní ezofagitidy (RE). Léčba, konzervativní či chirurgická, je indikována pouze u hernií, které působí tlakem na okolí nebo které jsou komplikovány slizničními změnami. V naší retrospektivní studii byla analyzována data 1000 pacientů ve věku 18–96 let gastrokopicky vyšetřených od ledna do června 2005 na IV. Interní klinice VFN a 1. LF UK v Praze. Při endoskopii byla HH definována jako cirkulární vytažení žaludku delší než 2 cm od bránice k linii Z (změřeno při vysouvání endoskopu). Dle velikosti byla HH klasifikována jako malá do velikosti 3 cm, jako velká nad 3 cm. HH byla zjištěna u 166 pacientů, což je 16,6 % z celkového počtu endoskopovaných. Z toho 53,61 % tvořili muži. Výskyt HH se liší v různých věkových kategoriích. V kategorii od 18–35 let se HH vyskytuje více u žen, od 35–70 let převládají muži, nad 70 let je výskyt HH větší u žen. Studie ukázala, že prevalence HH stoupá s věkem. Nejčastějším typem je axiální HH s výskytem 94,58 %. U 50 % pacientů s HH byla zároveň diagnostikována RE různého stupně, dle našich statistických zjištění významně častěji u mužů ($p < 0,001$).

KOURENÍ NA ZÁKLADNÍCH ŠKOLÁCH

Autor: Jan Všeticka, 6. r.

Školitelka: prof. MUDr. Drahošlava Hrubá, CSc., Ústav preventivního lékařství LF MU

Za posledních 10 let se výrazně zvýšil počet kouřících dívek ve věku 15 let. Tato studie měla za cíl zjistit příčiny této situace.

Na náhodně vybraných základních školách v Brně a v Dětském diagnostickém ústavu jsem osobně získal 210 dotazníků od žáků 8. a 9. tříd, 108 chlapců a 102 dívek. Do dotazníků jsem zařadil otázky na kouření, další zneužívané látky, hodnocení sama sebe a vztah k sociálně patologickým jevům.

Výsledky byly statisticky zpracovány programem EpiInfo. Porovnával jsem různé skupiny (dívky x chlapci, kuřáci x nekuřáci...), zda se liší v odpovědích na otázky. Za statisticky významnou jsem považoval hodnotu $p < 0,05$.

Nezjistil jsem významný rozdíl v kouření a užívání drog mezi chlapci a dívkami. Dívky se od chlapců lišily v sebeobrazě – téměř 3 x častěji jsou nespokojené se svým vzhledem, 3 x častěji se považují za obézní, 6 x častěji si neoblékají nějaké šaty jen proto, že se v nich cítí tlusté.

Kuřáci x nekuřáci (obě pohlaví) : kuřáci mají 3 x častěji kuřáky v rodině nebo kouřící kamarády. Kuřáci 8 x častěji vyzkoušeli marihuanu. Kuřáci méně často odsuzují vandalismus a krádež.

Kuřačky x nekuřačky : nekuřačky 7 x častěji považují kouření za odpudivé. Kuřačky jsou 4 x častěji zcela nespokojeny se svým vzhledem. Kuřačky častěji přemýšlí o jídle. Kuřačky mají více životních cílů než nekuřačky.

Děti z diagnostického ústavu se lišily od žáků ZŠ v mnoha odpovědích, častěji kouří, berou drogy, jsou spokojenější s tím jak vypadají, méně odsuzují sociálně patologické jevy.

Závěr: U dívek se potvrdila souvislost mezi negativním sebeobrazem a kouřením. Též existuje vztah mezi kouřením a postojem k sociálně patologickým jevům.

Potvrzuje se i teorie, že kouření je startovací drogou – kuřáci častěji vyzkoušeli i jiné drogy.



Předávání cen Akademického klubu 1. LF UK – na horním snímku s děkanem 1. LF UK Jakub Mínsk. Na dolním snímku Radka Švancarová.

ga

1

bo



ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY

- Babická Libuše, Mgr., 2. r. PGS
- Broučková Adéla, Ing., 3. r. PGS
- Bujanová Michaela, MUDr., 6. r. PGS
- Čtrnáctá Vlasta, Mgr., 3. r. PGS
- Doležalová Radka, MUDr., 3. r. PGS
- Douša Miroslav, MUDr., 2. r. PGS
- Fraško Roman, MUDr., 7. r. PGS
- Houšková Lucie, Mgr., 2. r. PGS
- Jatchvlíani Dato, MUDr., 4. r. PGS
- Kmoch Vladimír, MUDr., 2. r. PGS
- Koblížek Vladimír, MUDr., 3. r. PGS
- Kolesová Hana, Mgr., 3. r. PGS
- Kopečková Marta, Mgr., 4. r. PGS
- Křemen Jaromír, MUDr., 2. r. PGS
- Lehký Jan, MUDr., 1. r. PGS
- Panigaj Martin, Mgr., 3. r. PGS
- Podrazilová Lucie, MUDr., 5. r. PGS
- Pohludka Michal, Ing., 2. r. PGS
- Rathous Ivo, MUDr., 5. r. PGS
- Riljak Vladimír, MUDr., 2. r. PGS
- Stremeňová Jarmila, 2. r. PGS
- Vaňková Zdenka, MUDr., 3. r. PGS
- Vohánka Jaroslav, Ing., 2. r. PGS
- Vojtová Lucie, Ing., 2. r. PGS
- Zagatová Veronika, MUDr., 2. r. PGS
- Zelenka Jaroslav, Ing., 2. r. PGS

HODNOTITELSKÁ KOMISE

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



DETEKCE CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ V BUŇKÁCH DIFÚZNÍCH GLIOMŮ METODAMI MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY A JEJICH PŘÍNOS PRO DIAGNOSTIKU A LÉČBU

Autoři: Babická L., 2. r. PGS, Zemanová Z., Kramář F., Ransdorfová Š., Hrabal P., Kozler P., Michalová K.
Školitelky: prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc., RNDr. Zuzana Zemanová, CSc., Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Difusní gliomy jsou heterogenní skupina mozkových tumorů různých histologických subtypů, které se od sebe navzájem liší odezvou na léčbu a prognózou onemocnění. Jejich diagnostika založená na buněčné morfologii je subjektivní a rovněž terapeutické možnosti jsou značně omezené. V poslední době je proto kladen stále větší důraz na analýzu genomu buněk mozkových nádorů a na detekci specifických chromosomových aberací. Podle nálezu těchto aberací lze blíže specifikovat subtyp nádoru, upřesnit prognózu a eventuelně modifikovat terapii příslušného pacienta.

K detekci chromosomových aberací v gliálních buňkách používáme I-FISH s lokus-specifickými a/nebo á-satelitními sondami od firmy Abbott-Vysis™. V závislosti na typu nádoru sledujeme nejčastější chromosomové aberace, tj. delece tumor-supresorových genů *p53*, *p16* a *RB1*, delece chromosomových oblastí 1p36 a 19q13, amplifikace *EGFR* genu, trisomie chromosomu 7 a monosomie chromosomu 10.

Metodou I-FISH jsme vyšetřili vzorky nádorové tkáně celkem 86 pacientů s histologicky diagnostikovaným gliomem (3x pilocytický astrocytom, 7x fibrilární astrocytom, 10x difuzní astrocytom, 13x anaplastický astrocytom, 34x glioblastom, 4x oligodendrogliom, 15x anaplastický oligodendrogliom). I-FISH poskytla informativní výsledek u 80 pacientů (93 %), u 6 nemocných bylo vyšetření neinformativní z důvodu špatného odběru vzorku. Provedli jsme korelaci cytogenetických výsledků s histologickými a klinickými nálezy; I-FISH potvrdila nebo zpřesnila diagnózu a prognózu nemocného. Největší klinický dopad měl zejména nález kombinovaná delece 1p36 a 19q13 u šestnácti pacientů s anaplastickými oligodendrogliomy, který je považován za ukazatel dobré odpovědi na chemoterapii. U všech těchto nemocných byla proto doporučena chemoterapie jako primární léčebná modalita.

Molekulárně cytogenetická analýza je vhodná diagnostická metoda pro detekci chromosomových aberací v buňkách mozkových nádorů. Přispívá k upřesnění diagnózy a prognózy pacientů s difúzními gliomy a může vést k volbě individuální léčby podle stanoveného rizika.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 1A/8237-3 a MZO 00064165

LOKALIZACE BUNĚČNÉHO PRIONOVÉHO PROTEINU V KREVNÍCH DESTIČKÁCH.

Autoři: Adéla Broučková, 3. r. PGS, Karel Holada
Školitel: Dr. Ing. Karel Holada, Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Tento rok byl ve Velké Británii publikován již třetí případ přenosu vCJD krevní transfuzí. Za jejich původce je považován patologický prionový protein vznikající z normální formy označované PrPc. Informace o vlastnostech PrPc v krvi jsou potřebné pro porozumění jeho fyziologické funkce a v neposlední řadě jeho úlohy v přenosu prionových chorob krví. Lokalizaci PrPc jsme studovali imunofluorescenční mikroskopii. Na základě předchozích studií, které prokázaly expresi PrPc v α -granulích krevních destiček, jsme se zaměřili na sledování fluorescenčního signálu PrPc a α -granulárního markeru P-selektinu. V případě klidových destiček jsme dosáhli separovaného signálu PrPc a P-selektinu, přičemž PrPc poskytoval výrazný signál v intracelulární oblasti. α -granulární P-selektin nebyl detekován. Cytosolární lokalizace PrPc byla vyloučena dvojitým značením s aktinem. Po aktivaci destiček v suspenzi či adhezí na fibrinogen kolokalizoval PrPc a P-selektin v intracelulární oblasti, zatímco na buněčné membráně zůstaly signály separované. Tyto výsledky naznačují, že část intracelulární frakce PrPc je orientována na druhou stranu α -granulární membrány, než P-selektin. Izolace organelové frakce s následnou aplikací proteinasy K potvrdila, že větší část PrPc je citlivá vůči proteolýze, a tedy orientovaná vně organelové membrány. Rozdílná lokalizace PrPc a P-selektinu na cytoplazmatické membráně může být způsobena lokalizací PrPc v lipidových raftech, kterou jsme prokázali flotací na sacharozovém gradientu.

GACR310/04/0419, GACR310/05/H533

CLONING, LOCALIZATION AND CHARACTERIZATION OF NEURONAL-LIKE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN *APLYSIA CALIFORNICA*

Authors: M. Bugarová^{1,2}, 6. r. PGS, Y.V. Panchin², R.Sadreev², P.Uvarov²,
Tutors: prof. MUDr. P. Martásek, DrSc., 1. Department of Pediatrics and Center for Integrated Genomics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague a assoc. prof. Leonid Moroz, PhD., 2. Whitney Lab, University of Florida, St. Augustine, FL, USA

Intro: To study the role of NO on the level of individual neurons, we cloned the nitric oxide synthase from a model organism *Aplysia californica* and mapped NOS-containing (nitergic) neurons in the CNS. Further we characterized enzymatic activity of nitric oxide synthase (ApNOS) in the central nervous system of *Aplysia californica*, and provided biochemical evidence for NO-cGMP signaling in molluscs.

Methods: Nitroergic neurons were localized in the CNS using *in situ* hybridization and immunocytochemistry. ApNOS activity, was determined as citrulline formation. The activity of soluble guanylyl cyclase was stimulated as a result of NO interaction with its heme prosthetic group and the levels of cGMP were estimated by radioimmunoassay.

Results: A similar pattern of NOS expression was observed with both techniques and matched the known distribution of NADPH-d reactive neurons in the CNS. Up to 177 central neuronal somata were found to be labeled with NOS selective RNA-probes. ApNOS activity revealed its calcium-/calmodulin- and NADPH- dependence. A representative set of inhibitors for mammalian NOS isoforms suppressed NOS activity in Aplysia. The basal levels of cGMP were estimated to be 44.47 fmol/lg of protein. Incubation of Aplysia CNS with the NO donors and simultaneous phosphodiesterase inhibition prior to the assay showed a several fold increase in basal cGMP levels. Addition of a selective inhibitor of soluble guanylyl cyclase, completely abolished this effect.

Conclusion: This work confirms that ApNOS produces NO, which may indeed function as a messenger in the molluscan CNS, and that cGMP acts as one of its effectors.

Supported by grant GACR 303/05/0336 and GAUK 10/2004.

LOKALIZACE PYRUVÁT: NADP⁺ OXIDOREDUKTÁZY VE SPOROZOITECH CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Autoři: Vlasta Čtrnáctá, 3. r. PGS, Jeffrey G. Ault, František Stejskal, Janet S. Keithly
Školitelka: doc. MUDr. Marie Staňková, CSc., III. klinika infekčních a tropických nemocí 1. LF UK a FN Na Bulovce s poliklinikou

Cryptosporidium parvum je jednobuněčný, obligatorní, vnitrobuněčný parazit, který infikuje savčí gastrointestinální epitelium. Způsobuje průjemy u zdravých jedinců, které samovolně odeznívají, ale může také způsobit chronický, životu nebezpečný průjem u imunodeficientních pacientů, proti kterému zatím nebyla nalezena úspěšná léčba. Kryptosporidium obsahuje řadu enzymů, které využívá při svém anaerobním, fermentativním metabolismu, a které se v savčích buňkách nevyskytují. Pokud jsou tyto enzymy kritické pro přežití parazita, mohou být vhodnými kandidáty jako cílová struktura pro potenciální nový inhibitor, popřípadě lék proti kryptosporidíóze. Jedním z takovýchto enzymů je unikátní fúzní protein pyruvát: NADP⁺ oxidoreduktáza (CpPNO), která se skládá ze dvou odlišných, konzervovaných domén: z N-terminální pyruvát: ferredoxin oxidoreduktázy (PFO) a z C-terminální cytochrom P450 reduktázy (CPR). Na rozdíl od podobné fúze, která byla lokalizována v mitochondrii fotosyntetického bičíkovce *Euglena gracilis*, CpPNO nemá N-terminální mitochondriální směrovací sekvenci do mitochondrie. Pomocí dvou polyklonálních protilátek proti oligopeptidu v CpPFO a proti oligopeptidu v doméně CpCPR, které jsme použili pro western blot analýzu, jsme ukázali, že celá CpPNO fúze je exprimována ve sporozoitech *C. parvum*. Konfokální a transmisní elektronová mikroskopie potvrdila naši hypotézu, že CpPNO je lokalizován v cytoplazmě a ne v mitochondrii jako u *E. gracilis*. Navíc, distribuce CpPNO není striktně směřována do cytoplazmy, ale tento protein se nachází i v krystalickém tělísku, což je organela vlastní tomuto organismu, jejíž funkce není dosud známá.

VLIV NÍZKOKALORICKÉ DIETY NA MARKERY ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE U OBÉZNÍCH ŽEN A ÚLOHA ENDOKRINNÍ FUNKCE TUKOVÉ TKÁNĚ V TOMTO PROCESU

Autoři: R. Doležalová¹, 3. r. PGS, K. Anderlová¹, J. Housová¹, L. Božanská¹, D. Haluzíková^{1,2}, Z. Lacinová¹, J. Křemen¹ a M. Haluzík¹,
¹III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN
²Ústav tělových. lékařství 1. LF UK a VFN

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

Úvod: Za časně stádium procesu aterosklerózy je považována endoteliální dysfunkce (ED). Trvale zvýšená aktivace endotelu je doprovázena zvýšenou plazmatickou koncentrací solubilních endoteliálních adhesivních molekul (CAMs). Jedním z možných faktorů ovlivňujících funkci endotelu je porušená funkce tukové tkáně. Cílem naší práce bylo popsat vztah mezi akumulací viscerálního tuku a ED u obézních žen a zjistit vliv nízkokalorické diety (VLCD) na vybrané parametry ED.

Metodika: U 12 obézních žen (BMI 45,7±6,7kg/m²) před a po 3-týdenní VLCD a u 12 zdravých kontrol (BMI 24±4,3kg/m²) byly měřeny sérové koncentrace E-selektinu, sICAM-1, sVCAM-1, PAI-1, matrix metalloproteázy-9 (MMP-9), myeloperoxidázy (MPO), adiponectinu a resistinu.

Výsledky: Sérové koncentrace E-selektinu, sICAM-1, PAI-1 a resistinu byly signifikantně vyšší u skupiny obézních žen před VLCD ve srovnání s kontrolní skupinou (23,74 ± 10,81 vs. 9,13±4,7 ng/ml, 138,3±71,99 vs. 77,79±28,6 ng/ml, 42,87±14,76 vs. 32,45±6,23 ng/ml, 6,48±2,42 vs. 4,26±1,26, p<0.05). Koncentrace adiponectinu byly naopak signifikantně nižší u obézních žen než u kontrol (14,23 ±4,91 vs. 21,64 ±9,42). Nebyly nalezeny významné rozdíly v hladinách sVCAM, MPO a MMP-9. Vlivem VLCD došlo k signifikantnímu poklesu BMI a E-selektinu. Nebyl prokázán vliv VLCD na koncentrace VCAM-1, MPO a MMP-9, adiponectinu a resistinu. Stejně tak nebyly nalezeny korelace mezi hladinami adipocytárních hormonů a markerů ED bazálně ani po VLCD.



Závěr: Naše studie ukazuje, že zvýšené množství tukové tkáně u obézních žen je spojeno s ED a že i krátkodobá dietní intervence může pozitivně ovlivnit některé cirkulující parametry ED. Změny hladin adiponektinu a resistinu se v tomto procesu významně neuplatňují.

Podporováno grantem 8302-5, 7782-4 a VZ MZČR 64165.

BIOCHEMICKÉ MÁRKERY ABUSU ALKOHOLU U NEMOCNÝCH S CIRHÓZOU JATER

Autoři: Douša M., 2. r. PGS, Zima T., Brůha R.

Školitel: doc. MUDr. R. Brůha, CSc., IV. interní klinika - klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Nejčastější příčinou cirhózy jater v zemích Evropy a Severní Ameriky je abusus alkoholu. Informace o abstinenci alkoholu je zásadní informací při rozhodování o zařazení nemocných na transplantační listinu či o strategii symptomatické léčby u nemocných s cirhózou jater. Biochemické markery abusu jsou objektivními parametry požívání alkoholu mající různou senzitivitu, specificitu a liší se délkou abstinence během které se jejich hodnoty vrací k normálu. Běžně používané markery (GMT, poměr AST/ALT, MCV (střední objem erytrocytů) mají senzitivitu 27–52 % a specificitu 85–90 %. V posledních letech je za marker s vysokou senzitivitou a specifitou považován Carbohydrát deficientní transferrin (CDT).

Metodika: v naší studii jsem na naší klinice sledovali 66 jedinců, dle hodnoty CDT a dokumentace aktivního abusu alkoholu jsme stanovovali senzitivitu a specificitu tohoto vyšetření. Cílem této studie je získat racionální návod k diagnóze etiologie cirhózy jater dle biochemických markerů a informovat o něm klinickou veřejnost.

Výsledky: Vyšetřili jsme 41 jedinců s dokumentovaným aktivním abusem alkoholu (28 s cirhózou jater, 7 s chronickou pankreatitidou) a 25 kontrolních jedinců (15 s cirhózou, 2 s chronickou pankreatitidou) bez aktivního abusu alkoholu. Střední hodnota CDT v těchto skupinách byla 3.98±1.9% resp. 2.07±0.64% (stat. rozdíl $p > 0.001$), GMT 5.6±6.7 ukat/l resp. 2.1±0.65 ukat/l ($p=0.104$), AST 1.64±1.58 ukat/l resp. 1.34±1.4 ukat/l ($p=0.19$), ALT 1.19±1.47 ukat/l resp. 1.24±1.84 ukat/l ($p=0.97$), triglyceridy 1.3±0.7 mmol/l resp. 1.2±0.8 mmol/l ($p=0.83$), ferritin 423±530 ug/l resp. 728±773 ug/l ($p=0.36$) and MCV 99.3±9 fl resp. 92.1±9.4 fl ($p=0.003$). Hodnota CDT nad 3 % byla nejspolehlivější známkou abúzu alkoholu s senzitivitou 81 % a specifitou 97 %. Elevace GMT, poměr AST/ALT nad 2, vysoké MCV měli senzitivitu 71%, resp. 34%, resp. 54% a specifitu 64%, resp. 78%, resp. 88%. Přítomnost nebo nepřítomnost cirhózy jater neměla vliv na spolehlivost CDT. Kombinace pozitivního CDT a vysoké hodnoty MCV má 90% senzitivitu a 91% specifitu. Dle výsledků je CDT nejvhodnější rutinně stanovitelný biologický marker aktivního abúzu alkoholu, jehož spolehlivost může být zvýšena kombinací s vyšetřením základní biochemie a krevního obrazu (MCV).

CLINICAL TRIAL OF ITOPRIDE FOR TREATMENT POSTOPERATIVE PARESIS OF GASTROINTESTINAL TRACT AFTER LAPAROSCOPIC CHOLECYSTECTOMY.

Authors: Roman Fraško, 7. r. PGS, Robert Gürlich, Pavel Maruna

Tutor: doc. MUDr. Robert Gürlich, CSc., I. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN, Klinika transplantační chirurgie IKEM

Introduction: Postoperative ileus is a frequent adverse event after laparoscopic cholecystectomy. The goal of this study was to evaluate the potential benefit effect of prokinetic drug Itopride hydrochloride for amelioration of gastric motility in early post-operative period after this surgery.

Aims and methods: Fifty patients treated with itopride hydrochlorid or placebo perorally were examined in a randomized double-blind manner. Patients were observed for three days after LCE. EGG records were measured 6 hrs, 24 hrs nad 48 hrs after this surgery.

Results: In comparison of both groups nausea was more often in the day of surgery in placebo group and even in the second day. The physiological EGG curves were found in comparison placebo/itopride in 40%/56% patients ($p < 0,05$) in day of surgery, in 56%/68% patients ($p < 0,5$) first day after surgery, and in 80%/88% patients ($p < 0,5$) second day after LCE.

Conclusion: Perioperative use of Itopride advanced the normalisation of EGG curve after LCE. Itopride was well tolerated, and we did not observed serious adverse effects during therapy. Our data suggest that itopride accelerates restoration of postoperative ileus after laparoscopic cholecystectomy.

This work was supported by a grant IGA MZ CR 90453.

VÝZNAM METODY INTERFÁZICKÉ FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE PRO NEINVAZIVNÍ DIAGNOSTIKU KARCINOMU MOČOVÉHO MĚCHÝŘE

Autoři: Lucie Houšková, 2. r. PGS, Zuzana Zemanová, Mirko Babjuk, Michael Peší, Kyra Michalová
Školitelka: prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc., Centrum nádorové cytogenetiky Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Karcinom močového měchýře je heterogenní skupina maligních onemocnění. Nejčastější formou jsou uroteliální karcinomy, které představují až 90 % všech karcinomů močového měchýře. Nádory mohou mít povrchový charakter, mohou infiltrovat do okolní svaloviny nebo metastazovat. Variabilita nádoru je pravděpodobně determinována na genetické úrovni. U pacientů s karcinomy močového měchýře byla popsána řada chromosomových aberací, které významně korelují s klinickým stádiem onemocnění. Jejich identifikace přispívá nejen k upřesnění diagnostiky, ale i k predikci prognózy a odpovědi na léčbu.

Pro detekci genetických aberací v nádorových buňkách získaných z močového sedimentu používáme metodu vícebarevné interfázní FISH s využitím DNA kitu Vysis® UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit (Abbott - VYSIS™), který obsahuje centromerické sondy pro chromosomy 3, 7, 17 a lokus-specifickou sondu pro oblast 9p21 (p16/CDKN2A gen). U všech vzorků analyzujeme minimálně 25 morfologicky abnormálních buněčných jader. Celkem jsme analyzovali 117 vzorků močí, získaných od 70 mužů a 47 žen. Metoda I-FISH prokázala pozitivitu v 58 vzorcích z celkem 83 vzorků s histologicky stanovenou pozitivitou. Ve 14 z 26 s histologickým nálezem grade 1 (G1; 53,8 %), 16 z 26 s nálezem grade 2 (G2; 61,5 %) a ve 28 z 31 s nálezem grade 3 (G3; 90,3 %). Výsledky molekulárně-cytogenetické analýzy jsme porovnali s histologickými nálezy. U 11 pacientů s histologickým nálezem G1 jsme detekovali bíalelickou delecí lokusu 9p21. U dalších tří nemocných z této skupiny jsme prokázali aneuploidii chromozomů 3, 7 a 17 v jednom klonu a bíalelickou delecí lokusu 9p21 ve druhém klonu. U 6 pacientů s histologickým nálezem G2 jsme našli bíalelickou delecí lokusu 9p21. Dalších sedm nemocných z této skupiny mělo aneuploidii chromosomů 3, 7 a 17 a ve třech případech jsme detekovali oba klony. U dvou pacientů s nálezem G3 jsme prokázali bíalelickou delecí lokusu 9p21, dalších 25 mělo aneuploidii chromosomů 3, 7 a 17 a u jednoho nemocného jsme našli oba klony.

V této studii jsme prokázali korelaci mezi histologickou klasifikací a konkrétními chromosomovými aberacemi. Naše výsledky potvrzují, že I-FISH s kitem UroVysion® lze efektivně využít jako neinvazivní metodu pro selekci pacientů k cystoskopii.

Práce byla podporována granty MSM 0021620808 a IGA MZ ND8095-3.

LÉČBA ONKOLOGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ GIT NA 1. CHIRURGICKÉ KLINICE VFN A 1. LF UK (Rozbor za období 1. 1. 2004–31. 8. 2005)

Autoři: MUDr. Dato Jatchvliani, 4. r. PGS, doc. MUDr. Jan Šváb, CSc., MUDr. Ivana Vítková
Školitel: doc. MUDr. Jan Šváb, CSc., I. chirurgická klinika – břišní, hrudní a úrazová chirurgie 1. LF UK a VFN

Úvod: Problematika onkologických onemocnění je stále aktuální. Jen v ČR je každoročně zaznamenáno cca 55.000 nových případů. V současnosti se hledají jednak cesty k lepší diagnostice, jednak k účinnější terapii. Na naší klinice mimo standardní léčby malignit GIT, probíhá i ověřování metody peroperační identifikace sentinelové uzliny (SLN). Cíl: Statisticky zhodnotit úspěšnost dosavadní chirurgické léčby za sledované období. Poukázat (mimo klinická stadia onemocnění a složitosti provedených výkonů) na faktory ovlivňující osud pacienta. Srovnat přínos identifikace SLN se standardním postupem.

Metoda: Do souboru byly zařazeny pacienti s dg. C15-C21 za období 1. 1. 2004–31. 8. 2005. Zdroj – PC systém 1. chir. kliniky. Následně ruční zpracování jednotlivých chorobopisů, operačních protokolů, histopatologických a propouštějících zpráv. Při peroperačním hledání SLN byl použit již vypracovaný postup (indikace, kontraindikace, způsob provedení výkonu atd.)

Výsledky: Za sledované období bylo operováno 298 pacientů s malignitou GIT uvedenou v dokumentaci. Statistický rozbor strategie léčby ukázal nejčastější anatomické lokalizace nádoru v GITu, procentuální zastoupení provedených výkonů, nejčastější per- a pooperační komplikace atd. Byly vyhodnoceny i první výsledky identifikace SLN.

Závěr: Předkládáme statistické údaje k diskusi a k porovnání s výsledky z jiných renomovaných pracovišť. Ruční zpracování dat odhalil rozdíl cca o 15% v počítačové evidenci provedených výkonů ve sledovaném souboru. Nízký počet ošetřených pacientů t.č. nám v současnosti nedovoluje doporučit rutinní uplatnění koncepce SLN v onkochirurgii GIT.

MOLEKULÁRNÍ PŘÍČINY DISPOZIC KE VZNIKU ALKOHOLIZMU – OPIOIDNÍ A KANABINOIDNÍ SYSTÉM

Autoři: Kmoch Vladimír¹, 2. r. PGS, Šerý Omar², Znojil Vladimír², Zvolský Petr¹
¹Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN,
²Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita v Brně
Školitel: prof. MUDr. Petr Zvolský, DrSc.

Úvod: Ve vztahu k alkoholizmu byl zatím zkoumán bezpočet genových polymorfizmů, z nichž nejvíce studovanými byly polymorfizmy genů, které jsou součástí dopaminových a opioidních systémů. Poslední dobou je výzkum dispozic



k alkoholizmu zaměřován i na netradiční kandidátní geny, jakými jsou například interleukiny (9), které ovlivňují vývoj a diferenciaci dopaminového systému. Opioidní systém a kanabinoidní systém patří mezi modulátory dopaminového systému, které jsou v současné době v souvislosti s alkoholizmem studovány.

Hypotéza: Je známo, že aktivace opioidních receptorů zvyšuje aktivitu mezolimbického dopaminového systému, ze kterého projekce pokračuje do prefrontální kůry, striata, nucleus accumbens (5). Všechny tyto oblasti se podílejí na pocitech slasti, vznikajících užíváním psychoaktivních látek, na kterých vzniká závislost.

Endogenní opioidní systém je modifikován alkoholizmem a naopak. Je uznávána teorie „Opioid compensation hypothesis“, která tvrdí, že deficit endogenních opioidů vede k alkoholovému cravingu a zvýšené konzumaci alkoholu. Je prokázáno, že opioidní antagonista naltrexon v nízkých dávkách snižuje příjem alkoholu u závislých na alkoholu.

Výzkum se v posledních několika letech zaměřuje na endogenní kanabinoidní systém. Aktivace těchto receptorů vede ke zvýšení hladin endoopioidů (4), mimo to zvyšuje syntézu serotoninu, inhibuje dopaminovou aktivitu, má anticholinergní účinky, prokoagulační účinky. To vše ovlivňuje náladu, chuť k jídlu, paměť, vnímání bolesti, imunosupresi aj. Jak ukazují animální modely, delece CB1 receptoru u myši vede k výraznému snížení příjmu alkoholu (3) a lze předpokládat, že tento receptor hraje roli ve vývoji syndromu závislosti, což by mohlo být terapeuticky užitečné u alkoholizmu například využitím antagonistů kanabinoidních receptorů.

Metodika: Bude použit rozšířený soubor 450 osob závislých na alkoholu dle MKN-10, DSM IV a MAST a 450 zdravých kontrol. Ze zmrazené krve po izolaci DNA izolačním kitem MoBio (USA) bude provedena amplifikace specifického úseku DNA metodou PCR, poté vizualizace na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, následuje restriční analýza vhodným enzymem a digitální snímek fotoaparátem Olympus Camedia 3030. Závěrečná analýza dat povede ke statistickému zpracování programem CCS Statistica, USA)

Závěrem je možné konstatovat, že mezi kandidátní geny, které by měly být zkoumány ve vztahu k alkoholizmu v naší práci, patří polymorfismy genů pro receptory OP 3 a CB1.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR NF/5991-3/2000.

VLIV CHOPN NA NASÁLNÍ MUKOCILÁRNÍ CLEARANCE U BÝVALÝCH KUŘÁKŮ (PRVNÍ VÝSLEDKY)

Autoři: V. Koblížek¹, 3. r. PGS, F. Salajka¹, M. Dittrich², I. Krulichová¹, M. Tomšová¹
LF¹, Farmaceutická fakulta² UK v Hradci Králové

Školitel: doc. MUDr. F. Salajka, CSc., Plicní klinika, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové

Úvod: Dle sporadických literárních dat lze u nemocných s CHOPN předpokládat existenci zánětlivých změn také v nosní sliznici. S chronickým zánětem je pravděpodobně asociována sekundární porucha ciliární činnosti (tzv. sekundární ciliární dyskineza).

Cíl: Pomocí měření nasální mukociliární clearance posoudit funkci cílů respiračních epitelů a ev. prokázat přítomnost ciliární dyskinezy v této lokalitě u nemocných s CHOPN a ukázat tím na možné šíření zánětu (pomíněného CHOPN) do horních částí respiračního systému.

Metodika: Vyšetření mukociliární clearance pomocí sacharinového testu, jehož výsledkem je tzv. čas nasální mukociliární clearance (NMCC čas). Výsledky: Od ledna do prosince 2005 jsme zatím vyšetřili NMCC čas u 19 bývalých nekuřáků s CHOPN (15 mužů a 4 žen) ve věku od 42 do 81 let (průměrný věk 62,5 let). CHOPN (1xI, 8xII, 6xIII, 4xIV dle GOLD) byl u všech ve stabilní fázi (nejméně 6 T bez exacerbace). Kontrolní skupinou bylo 19 zdravých dobrovolníků (nekuřáků, neatopiků, bez nasální léčby a bez respiračního infektu v předchozích 6 T). Jednalo se o 7 mužů a 12 žen ve věku od 22 do 72 let (průměrný věk 42,6 let). NMCC čas u nemocných s CHOPN byl v rozmezí 5 minut 57 sekund až 120 minut (průměrná hodnota 31 minut 1 sekunda). NMCC čas u kontrol byl v rozmezí 2 minut 19 sekund až 24 minut 57 sekund (průměr 11 minut 45 sekund). Dle statistické analýzy (test Mann-Whitney) je NMCC čas u nemocných CHOPN signifikantně pomalejší než u zdravých dobrovolníků (p-hodnota = 0,002). Stupeň závažnosti CHOPN nekoreloval s NMCC časem (p-hodnota = 0,584).

Závěr: Bývalí kuřáci s CHOPN mají signifikantně delší NMCC čas než zdraví dobrovolníci. NMCC čas nekoreluje se stupněm CHOPN (dle GOLD). Tato první data našeho ciliárního výzkumu (zahrnujícího také ultrastrukturální a nativní mikroskopické vyšetřování cílů) ukazují na možnost existence postižení nasálního mukociliárního transportu u nemocných s CHOPN ve srovnání se zdravými dobrovolníky.

Práce je podporována IGA MZ ČR (NR 8419-4/2005) a MZ 000179906.

INFLUENCE OF SONIC HEDGEHOG ONTO THE AORTIC ARCHES DEVELOPMENT IN AVIAN EMBRYOS

Author: Mgr. Hana Kolesová, 3. r. PGS

Tutor: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc., Anatomický ústav 1. LF UK

Sonic hedgehog (Shh) is produced in embryos in notochord floor plate and foregut and influences formation of many structures including blood vessels. The aim of this study is to clarify the impact of Shh onto the aortic arches development. Quail embryos in developmental stages 10 - 23 HH were used. Function of Shh was inhibited by cyclopamine (5ug/ml), which was delivered in stages 9 -13 HH and embryos were re-incubated. As a second type of Shh inhibition the 5E1 antibody was used. Antibody was produced abundantly to the embryo by the hybridoma cells, which were

delivered into the amnion cavity. The expression of Shh was detected by mRNA hybridisation in situ and by immunohistochemistry (5E1 Ab). Vascular system was visualised with QH1 antibody and with ink perfusion. Shh mRNA was detected from stage 11 HH in notochord and floor plate of the neural tube and from stage 18 HH also in the foregut. The Shh protein was detected approximately three stages later than mRNA. Aortic arches are formed in branchial region in cranio-caudal gradient from the stage 11 HH. In embryos inhibited with cyclopamine branchial arches were reduced in form (the head of the embryo was markedly malformed - open brain syndrome, cyclopia). Aortic arches were developed; however, their lumen was enlarged and irregular. The application of cells producing 5E1 antibody has similar effect on aortic arches as cyclopamine. Moreover, it inhibits capillary plexuses formation and leads to the increase of QH1 positive cells (hemopoietic cells, macrophages and QH1 positive cell debris) in mesenchyme of branchial arches.

These observations demonstrate the effect of Shh on angiogenesis in branchial arches.

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ ANALÝZA DBH A MOŽNOSTI MRI U HYPERKINETICKÝCH DĚTÍ

Autoři: Kopečková Marta, 4. r. PGS, Zagatová Veronika, 2. r. PGS, Paclt Ivo, Křepelová Anna,

Školitelé: prof. MUDr. Goetz Petr, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, doc. MUDr. Ivo Paclt, CSc., Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN

Hyperkinetický syndrom se vyskytuje asi u 6-10% dětské populace v poměru chlapců a dívek 3:1. K základním symptomům patří nadměrná aktivita, nepozornost a impulzivita, výjimkou nejsou ani další přidružené psychické poruchy. ADHD je onemocnění multifaktoriální a geneticky heterogenní. V současné době je známo více než 30 genů podílejících se na vzniku a vývoji onemocnění. Jednotlivé alely těchto genů mohou být v populaci relativně časté, protože nepředstavují klasické mutace, ale polymorfismy, které jsou příčinou arteficiální aktivity produktu. Zaměřili jsme se na hlubší studii genu pro DBH, v němž provádíme molekulárně-genetickou analýzu 7 polymorfismů, konkrétně Taq B1/B2, G444A, C1912T, 5'-ins/del, G910T, C-1021T a C1603T v souboru 100 dětí s ADHD. Sledujeme, které z polymorfismů mají majoritní vliv na pokles hladiny DBH v séru a tudíž, které se významně podílí na závažnost hyperkinetického syndromu u dětí. Výsledky jsou též porovnány s polymorfismy v dalších kandidátních genech a s kontrolní skupinou dětí, u nichž byly příznaky ADHD vyloučeny testem Connersové. Na základě současných poznatků získaných zobrazovacími metodami lze soudit, že klíčovým nálezem u ADHD jsou drobné dysfunkce ve frontální a striatální oblasti mozku. Dále byly zaznamenány změny objemu v oblasti cerebella, nucleus caudatus a globus pallidus. Podle řady studií je ve zdravé populaci objem bazálních ganglií pravé strany větší než levé, zatímco u dětí s ADHD je tato asymetrie obrácená.

Předmětem naší práce je též měření vybraných struktur bazálních ganglií na MRI a jejich hodnocení pomocí programu Scanview.

Předběžné výsledky svědčí o souvislosti mezi polymorfismy TaqA1 (v genu pro DRD2), C-1021T, C910T, TaqB1, C1603T a C1912T (v genu pro DBH) a ADHD. Homozygoti pro tuto rizikovou alelu se ve vyšetřovaném souboru vyskytovaly s výrazně vyšší frekvencí u postižených dětí než u kontrolní skupiny. U ostatních genů byly rizikové alely přítomny v nadpoloviční většině ve skupině dětí s ADHD.

VÝZNAM ENDOKRINNÍ FUNKCE TUKOVÉ TKÁŇE U KRITICKY NEMOCNÝCH

Autoři: Křemen J., 2. r. PGS, Dolinková M., Lacinová Z., Krajíčková J., Haluzík M.

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

Úvod: Cílem naší studie bylo zkoumat podíl endokrinní produkce tukové tkáně na rozvoji inzulínové rezistence kriticky nemocných pacientů.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 10 pacientů podstupujících elektivní kardiochirurgický výkon hospitalizovaných na jednotce intenzivní pooperační péče (JIP). Vzorky tukové tkáně byly odebírány na začátku a na konci operace. Krevní odběry byly provedeny předoperačně, bezprostředně po operaci a po 6, 12, 24, 48 a 120 hodinách od přijetí na JIP. Hladiny cytokinů byly měřeny na přístroji Luminex, exprese příslušných mRNA v tukové tkáni pomocí RT PCR.

Výsledky: Během operace nedošlo k významným změnám exprese mRNA pro leptin a adiponektin v žádné tukové tkáni. Došlo však k významnému vzestupu mRNA pro IL-6 v obou typech tukové tkáně, pro resistin a TNF- α pouze v subkutánní tukové tkáni. K výraznému vzestupu sérových koncentrací došlo u IL-6, mírnější vzestupy sérových koncentrací byly zaznamenány u TNF- α , leptinu a resistinu. Naproti tomu došlo k mírnému pooperačnímu poklesu koncentrací adiponektinu. Inzulínová rezistence byla nejvyšší ve 12. hodině po operaci, kdy bylo potřeba podat 8-násobnou dávku inzulínu oproti výchozí dávce.

Závěr: V naší studii jsme prokázali, že jak viscerální, tak i subkutánní tuková tkáň je významným producentem prozánětlivých cytokinů. Tyto faktory se pak velmi pravděpodobně podílejí na vzniku pooperační inzulínové rezistence u pacientů po elektivním kardiochirurgickém výkonu.

Podporováno projektem CLINICIP a MSM 0021620814.



OŠETŘENÍ HLUBOKÝCH DEFEKTŮ KLOUBNÍ CHRUPAVKY TRANSPLANTACÍ AUTOLOGNÍCH CHONDROCYTŮ NA PEVNÉM NOSIČI

Autoři: MUDr. Jan Lehký, 1. r. PGHS, doc. MUDr. Aleš Podšubka, CSc., prof. MUDr. Pavel Dungi, DrSc.
Školitel: prof. MUDr. Pavel Dungi, DrSc., Ortopedická klinika 1. LF UK a Fakultní nemocnice Motol

Úvod: Hluboké defekty kloubní chrupavky nemají schopnost spontánního zhojení a vedou k časnému rozvoji artrózy. Vyplnění defektu hyalinní chrupavkou umožňují v současnosti dvě chirurgické metody. Vyplnění defektu osteochondrálními štěpy ze zdravého místa kloubní plochy nebo vyplnění defektu transplantací autologních chondrocytů. Tato metoda představuje v dnešní době optimální řešení. Problém je ve způsobu fixace namnožených chondrocytů v defektu. Novou možností představuje vyplnění defektu chondrocyty fixovanými na biologickém nosiči z kyseliny hyaluronové nebo kolagenu. Cílem studie bylo v prospektivní studii ověřit možnosti této metody a ověřit kvalitu novotvořené chrupavky.

Metodika: U vybraných pacientů s vhodným chondrálním defektem byla odebrána drobná částička zdravé chrupavky, následně pomnožena in vitro a fixována na biologickém nosiči. U poloviny pacientů byl použit nosič z kyseliny hyaluronové a u poloviny z kolagenu. V odstupu 4 týdnů byl implantát fixován do defektu. Vhojování bylo sledováno pomocí MRI ve 3 měsíčních intervalech. Po 12 měsících po implantaci byla provedena kontrolní artroskopie s vyhodnocením mechanických vlastností transplantované tkáně pomocí impresního tonometru a odebráním chrupavky na histologické a imunohistochemické vyšetření.

Výsledky: Při artroskopické kontrole byla novotvořná chrupavky hodnocena makroskopicky, byla změřena její tuhost, byla odebrána punkční biopsie na histologické vyšetření a byla zhotovena fotodokumentace. MR vyšetřením bylo kontrolováno vhojování a přestavba štěpů. Ve spolupráci s laboratoří biomechaniky člověka při ČVUT bylo vyvinuto a v praxi odzkoušeno měřicí zařízení pro peroperační stanovení tuhosti kloubní chrupavky. U pacientů 10 měsíců po operaci byly naměřeny poměrné hodnoty 60–80 %. Histologický nálezní prokazuje postupné vyzrávání od vazivové chrupavky k plnohodnotné chrupavce hyalinního typu. Nově vytvořená chrupavka se liší od klasické kloubní chrupavky pouze nerovnoměrným rozmístěním chondrocytů a přítomností silných snopců kolagenních fibril.

Závěr: Transplantace autologních chondrocytů představuje slibnou metodu v ošetření hlubokých chondrálních defektů. Z výsledků zahraničních studií vyplývá, že výsledkem by mělo být plnohodnotné obnovení kloubní plochy a návrat k plnému zdraví. Vysoké finanční náklady je třeba srovnat s náklady na dlouhodobé léčení pacientů s časným rozvojem artrózy, nutno je zohlednit snížení kvality jejich života, omezení aktivity a pracovní výpadky. Celkový přínos metody je třeba hodnotit v časovém horizontu minimálně 10 let

EXPRESSION OF CELLULAR PRION PROTEIN ON HUMAN ERYTHROCYTES

Authors: Martin Panigaj, 3. r. PGS, Hana Glierova, Adela Brouckova, Karel Holada
Tutor: Karel Holada, Dr., Institute of Immunology and Microbiology

Cellular prion protein (PrP^c) and its conformational altered form (PrP^{Sc}) play important role in prion diseases. PrP^{Sc} is only known molecular marker of illness. Experimental transmission was proved in laboratory animals. Third transmission of vCJD by blood transfusion was described this year. It refers to urgent need of screening test for prion disease. PrP^c is expressed on white cells and platelets. Opinions on its presence on erythrocytes (RBC) are different. Its expression on RBC was demonstrated by flow cytometry (FACS) with different results. We performed quantitative FACS study of PrP^c on RBC of 8 health donors. We used 3 different antibodies, which detected 36 (FH11), 80 (3F4) and 258 (6H4) molecules PrP^c/cell. Altered conformation may lead to unavailability of 3F4 epitope as was shown in proteolysis resistant PrP^{Sc}. Incubation of RBC with proteinase K led to total proteolysis of PrP^c. Reduced binding of FH11 and 3F4 may be due to the truncation of N-term of PrP^c. Immunoblot with 6H4 showed that molecular weight of glycosylated PrP^c is slightly higher than brain PrP^c but after deglycosilation there is no difference. Decreased binding of 3F4 to denatured PrP^c-RBC show, that loss of reactivity is not caused by epitope masking. This suggests that epitope for 3F4 (MKHM) is modified. We speculate that Lys (K) on PrP^c may be glycosylated. In vitro modification of brain PrP^c by NHS-Biotin led to decrease of 3F4 binding. So, controversial published data about PrP^c-RBC expression were likely caused by inappropriate antibody choice. If PrP^{Sc} is modified in the same way, it may interfere with its detection in blood. GAČR 310/04/0419, 310/05/H533.

VOLUMETRIE U NEMOCNÝCH S NEUROPSYCHIATRICKÝM LUPUS ERYTEMATODES

Autoři: Lucie Podrazilová, 5. r. PGS, Věra Peterová, Marta Olejárová, Jan Krásenký, Petr Kozelek, Zdeněk Seidl, Ctibor Dostál
Školitel: prof. MUDr. Ctibor Dostál, DrSc., Revmatologický ústav Praha
Odborný konzultant: as. MUDr. Věra Peterová, CSc., MR oddělení Radiodiagnostické kliniky

Úvod: Systémový lupus erytematodes (SLE) je autoimunitní, mnohaorganové onemocnění. Neuropsychiatrické postižení, tzv. NPSLE se vyskytuje u více než poloviny pacientů a zahrnuje projevy jak neurologické postihující centrální i periferní nervový systém, tak i psychiatrické. Neuropsychiatrické projevy jako primomanifestace jsou přítomny u 20 % pacientů se SLE. Nejsenzitivnější k zobrazení patologických ložisek v mozku je vyšetření magnetickou rezonancí (MR), význam má sledovat protilátky v séru i likvoru. Podle převládajících klinických projevů jsou doplněna ostatní funkční vyšetření (elektromyografie, elektroencefalografie, evokované potenciály, kognitivní testy...).

Metodika: Vyšetřili jsme objem patologických ložisek mozku u 29 pacientů s NPSLE (28 žen a 1 muž, Ø 41 let), 24 SLE pacientů (21 žen a 3 muži, Ø 35 let) a 16 zdravých kontrol (14 žen a 2 muži, Ø 37 let) pomocí tenkých 1,5mm řezů v MR v sekvenci flow attenuated inversion recovery (FLAIR). Použity byly statistické testy: analýza rozptylu (ANOVA), chí-kvadrát test a Fischerův test.

Výsledky: Patologický objem ložisek u NPSLE byl $19,5 \pm 27,8 \text{ cm}^3$, u SLE pacientů byl $3,4 \pm 5,4 \text{ cm}^3$ a u zdravých kontrol $0,7 \pm 0,8 \text{ cm}^3$. Průměrné trvání nemoci bylo u NPSLE pacientů 7 let a u SLE pacientů 3 roky. Průměrná doba od vzniku prvních neuropsychiatrických projevů je 5 let.

Závěr: Objem lézí se statisticky významně liší mezi skupinami ($p < 0,001$). V NPSLE skupině spolu statisticky významně koreluje objem lézí na trvání nemoci a době od výskytu prvních neuropsychiatrických projevů ($p < 0,01$). Závislost objemu lézí na věku vyšetřených se neprokázala.

Práce vychází z grantového projektu IGA MZ ČR NR 8459-3.

ANALYSIS OF CHR-3 (*NHR-23*) LOSS OF FUNCTION IN L1 LARVAL STAGE USING WHOLE GENOME MICROARRAYS AND COMPARATIVE TWO DIMENSIONAL PROTEIN CHROMATOGRAPHY

Authors: ¹Michal Pohludka, 2. r. PGS, ²Jaroslav Vohanka, ¹Petr Liby, ²Marta Kostrouchova
Tutor: MUDr. ¹Zdenek Kostrouch, CSc., ¹Laboratory of Molecular Pathology and ²Laboratory of Molecular Biology and Genetics, Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague

CHR3 (*nhr-23*, NR1F4) is an evolutionarily conserved nuclear receptor involved in the regulation of molting and body morphology in larval development. We studied the role of CHR-3 (*nhr-23*) by RNAi in L1 stage and analysed the phenotype on mRNA and protein levels using whole genome microarrays (Affymetrix) and a comparative two dimensional protein chromatography by ProteomeLab™ PF 2D Protein Fractionation System. Protein profiling was achieved by Isoelectric chromatofocusing used as the first dimension separation and reversed phase chromatography separating proteins by hydrophobicity as the second dimension. The differentially expressed proteins were detected by ProteoVue and DeltaVue Software. Microarrays data subjected to computer analysis using GeneSpring program detected clusters of similarly regulated genes. Two dimensional chromatography revealed multiple fractions containing differentially expressed proteins in CHR3 (*nhr-23*) inhibited fractions suitable for analysis by mass spectroscopy. Genome and proteome wide analysis may help to further characterize phenotypes of gene inhibition by RNAi.

KONZERVATIVNÍ MOŽNOSTI LÉČBY KOMPLIKACÍ NITROHRUDNÍ GASTROEZOFAGEÁLNÍ ANASTOMÓZY

Autoři: Rathous Ivo, 5. r. PGS, Kotrlíková Eva, Lukáš Milan, Šváb Jan
Školitel: prof. MUDr. Milan Lukáš CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Jícnové anastomózy mají velký počet komplikací. Příčina je v chyběni serózy na jícnu v jeho nitrohrudním průběhu. Umístění jícnu v mediastinu je dalším nepříznivým faktorem. Při vzniku mediastinitidy ne nemocný ohrožen úmrtím ve vysokém procentu. Možné komplikace anastomózy jsou dehiscence, píštěl, absces, krvácení, stenóza. Dehiscence je defekt v anastomóze, píštěl je vytvořený kanál mezi anastomózou a dalším anatomickým prostorem či zevním prostředím, píštěl může tedy být vnitřní či zevní. Absces vzniká oraničením zánětlivého ložiska pyogenní membránou. Krvácení nastává ihned po operaci či v několikadenním až několikatydením odstupu po operaci může být do lumen zaživačoho traktu či do okolních anatomických prostor. V tomto případě do mediastina či dutiny břišní. Stenóza může vzniknout časně, již primárním hojením anastomózy či v delším časovém odstupu. Bude proveden rozbor příznaků a diagnostiky komplikací.

Bude demonstrována kazuistika nemocného operovaného na jiném pracovišti. Po nitrohrudní gastroezofageální anastomóze byl propuštěn domů, rehospitalizován na pracovišti, kde byl operován, znovu propuštěn domů. Dále byl hospitalizován na plicním oddělení pro abscedující pronchoneumonii s hnisavou expektorací. Po propuštění se obrátil na naše pracoviště a po prokázání úniku kontrastní látky anastomózou do abscesové dutiny v pohrudniční dutině byla zavedena nsojejunální sonda a nemocný po dobu 6 týdnů vyživován pouze touto sondou ambulantně. Bez dalších zásahů došlo ke zhojení abscesu i anastomózy. Nemocný perorálně realimentován a je po dobu 6 měsíců bez obtíží.

NIKOTIN ZMÍRNÍ DEGENERACI NEURONŮ HIPPOCAMPU VYVOLANOU PODÁNÍM KAINÁTU

Autor: MUDr. Vladimír Riljak, 2. r. PGS
Školitel: prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc., Fyziologický ústav 1. LF UK

Aplikace kainátu, analogu glutamátu, je celosvětově užívaný experimentální model lidské temporální epilepsie. Na experimentálních modelech řady jiných chorob (Parkinsonova choroba apod.) bylo prokázáno, že nikotin má nebo by mohl mít protektivní a léčebný potenciál. Tato látka je v posledních letech intenzivně studována, neboť její použití při terapii zmíněných chorob se zdá velmi slibné.



Cílem této práce bylo objasnit, zda centrální nervový systém (především hippocampus), projeví mírnější degenerativní změny v případě, že bude zvířatům před podáním kainátu aplikován nikotin.

Experiment byl prováděn na laboratorních potkanech kmene Wistar, stáří 35 dní.

První skupině byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg. Druhé skupině byl podán kainát 10mg/kg. Třetí skupině byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg a následně jim byl po 30 minutách podán kainát 10mg/kg (konvulsivní dávka). Čtvrté skupině byl podán fyziologický roztok v objemech odpovídajících látkám účinným. Dva dny po aplikaci byla zvířata transkardiálně perfundována neutrálním paraformaldehydem, jejich mozky obarveny jednak kombinací barvení Fluoro-Jade B a Hoechst (vyhodnocení rozsahu neurodegenerace) a jednak byly barveny na NADPH-diaforázu (NADPH-d), ke kvantifikaci nitrergního systému CNS. Hippocampus zvířat, jimž byl před aplikací kainátu podán nikotin, vykazoval výrazně mírnější degenerativní změny, než hippocampus zvířat, kterým byl podán pouze kainát. Méně postiženy byly především oblasti CA1 a CA3 hippocampu. Kvantifikace NADPH-d pozitivních buněk ukázala signifikantní nárůst jejich denzity po aplikaci nikotinu a jejich výrazný úbytek po aplikaci kainátu. U skupiny, které byly podány obě látky došlo k signifikantnímu nárůstu denzity NADPH-d pozitivních buněk v CA1 oblasti hippocampu.

Zjištěný úbytek denzity NADPH-d pozitivních buněk u zvířat, kterým byl podán pouze kainát, je zřejmě způsoben excitotoxickými vlastnostmi kainátu, které mohou vyvolat zánik nervových buněk. Vzestup denzity NADPH-d pozitivních buněk u skupiny, které byl podán pouze nikotin, je možno vysvětlit změnou genové exprese nitric oxid syntázy a následným vzestupem rezistence CNS k další noxe (v našem případě kainátu).

DIPEPTIDYLPEPTIDÁZE-IV AKTIVITOU A/NEBO STRUKTUROU HOMOLOGNÍ (DASH) MOLEKULY V LIDSKÝCH MOZKOVÝCH NÁDORECH.

Autorka: Jarmila Stremeňová, 2. r. PGS

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

Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV) odštěpuje X-Pro dipeptidy z N-konce řady biologicky aktivních peptidů. Tato proteolytická úprava může vést ke kvalitativním i kvantitativním změnám jejich signálního významu. Tím se spolu s dalšími DPP-IV aktivitou a/nebo strukturou homologními molekulami (DASH) podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci, migrace, invazivity, adheze a apoptózy a proto je studován její význam v imunoregulačních procesech a v patogenezi nádorových onemocnění. Cílem naší práce bylo popsat dosud neznámý expresní vzorec DASH molekul v lidských nenádorových mozkových tkáních a nádorech astrocytárního původu různého WHO stupně malignity. Prostřednictvím real time RT-PCR, enzymové aktivní histochemie, imunohistochemie a kinetického fluorimetrického stanovení enzymatických aktivit s inhibičními studiemi jsme prokázali v nádorech vysokého stupně malignity (WHO grade III a IV) významně vyšší enzymatickou aktivitu DASH molekul, nesenou většinou DPP-IV, 8 a 9. Tato aktivita, stejně tak jako exprese mRNA DPP-IV, těsně korelovala s expresí receptoru CXCR4, jehož vazebný partner, chemokin SDF1, významný prorůstový faktor astrocytárních tumorů, je substrátem DPP-IV aktivity.

Naše výsledky potvrzují přítomnost DASH molekul v astrocytárních nádorech, popisují změny jejich expresního vzorce související se stupněm malignity a naznačují funkční zapojení DASH molekul do auto- a parakrinních smyček regulujících růstové vlastnosti nádorových buněk.

STUDIUM CYTOKINŮ A REGULAČNÍCH MOLEKUL U ANCA-ASOCIOVANÉ VASKULITIDY

Autorka: MUDr. Zdenka Vaňková, 3. r. PGS

Školitel: MUDr. Helena Marečková, CSC., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: ANCA-asociovaná vaskulitida (AAV) je autoimunitní onemocnění charakterizované nekrotizujícím zánětlivým postižením malých cév, v jehož patogenezi se uplatňují efektorové mechanismy jak humorální, tak buněčné imunity. Cílem této práce bylo komplexně posoudit buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď u souboru pacientů s AAV v různém stádiu onemocnění.

Metodika: Metodou fluorescenční průtokové cytometrie jsme vyšetřili 94 vzorků periferní krve od 69 pacientů s AAV (42x anti-PR3 pozitivní, 27x anti-MPO pozitivní; 39x Wegenerova granulomatóza (WG), 19x mikroskopická polyangiitida (MPA), 9x renálně limitovaná vaskulitida (RLV) a 2x syndrom Churga a Straussově (CSS); 51x vyšetření v době remise, 43x v době aktivity onemocnění) a 32 zdravých jedinců. Stanovovány byly konstituční i aktivační povrchové molekuly lymfocytů, exprese chemokininových receptorů a produkce intracelulárních cytokinů.

Výsledky: Pacienti s AAV vykazují zvýšenou produkci interferonu gama (IFN γ) a vyšší expresi povrchových molekul CCR5, CD30, CRTH2, HLA-DR, CD80 i CD86 oproti zdravým kontrolám ($p < 0,02$). U pacientů anti-PR3 pozitivních byla prokázána nižší exprese CXCR3 a vyšší exprese CD30 na CD4 pozitivních lymfocytech ve srovnání s anti-MPO pozitivními pacienty ($p = 0,03$). Produkce IL2 a CCR5 byla nižší u pacientů s WG a MPA než u pacientů s RLV ($p < 0,05$).

Závěr: Naše výsledky potvrzují aktivaci imunitního systému a T lymfocytů u pacientů s AAV. Rozdílné výsledky u pacientů anti-PR3 a anti-MPO pozitivních svědčí pro rozdílnou regulaci imunitní odpovědi, přičemž anti-PR3 pozitivní pacienti a také pacienti s generalizovanou formou onemocnění vykazují posun imunitní odpovědi k Th2 typu.

AN EXPRESSION STUDY OF SEVEN PUTATIVE NUCLEAR RECEPTORS ORGANIZED IN A CLUSTER ON CHROMOSOME V OF CAENORHABDITIS ELEGANS

Authors: ¹Jaroslav Vohanka, 2. r. PGS, ²Michal Pohludka, ²Zdenek Kostrouch and ¹Marta Kostrouchova
¹Laboratory of Molecular Biology and Genetics and ²Laboratory of Molecular Pathology, Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague.
Tutor: MUDr. Marta Kostrouchová, CSc., ¹Laboratory of Molecular Biology and Genetics

Chromosome V contains a group of seven sequences recognized by the computer program GeneFinder as potential nuclear hormone receptors (NHRs). In order to identify whether genes from this cluster may be functional NHRs, we studied their expression during *C. elegans* development. RT-PCR identifies transcripts of all seven genes. The expression of all members of this cluster starts in embryos. Six of these genes are expressed throughout development while one member of this cluster is only expressed in embryos and early larval stages. We prepared constructs of GFP fusion genes containing various regions of genomic sequences. At least 2 different fragments containing putative promoters were prepared for each gene of the cluster; one consisting of approximately 500 bp and a second of approximately 2000 bp. The longer constructs contain parts of the coding sequences of the preceding genes. Our results show that members of this gene cluster have a diverse expression pattern and are likely to be functional NHRs.

STUDIUM ZMĚN PROTEINŮ U NEFROTICKÉHO SYNDROMU

Autorka: Ing. Lucie Vojtová, 2. r. PGS
Školitel: prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Proteinurie je způsobena zvýšenou permeabilitou glomerulární bazální membrány, poškozením membrány, podocytů a narušením sekrečně-reabsorbčních tubulárních pochodů. U proteinurií není dosud známo přesné složení modifikovaných či degradovaných proteinů v moči, ale předpokládá se jejich možný toxický vliv na tubulární buňky a progresi onemocnění. Analyzovali jsme proteiny v moči u pacientů s nefrotickým syndromem metodou 2D elektroforesy. Dále jsme studovali vliv odstranění albuminu na analýzu vzorku a účinek proteas v moči. Vyšetřili jsme 20 vzorků moče pacientů s nefrotickým syndromem a jinými nefropatiemi (amyloidosa AL, Wegenerova granulomatosa).

K odstranění albuminu u vzorků, kde je koncentrace albuminu vyšší jak 2 g/l, byla využita metoda srážení síranem amonným. Proteiny jsou poté děleny na základě svých isoelektrických bodů metodou isoelektrické fokusace na polyakrylamidových stripech s imobilizovaným lineárním gradientem pH 3-10 a následně jsou separovány SDS elektroforeosou v 12 % polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti. Vizualizace proteinů je prováděna stříbrem a k hodnocení elektroforeogramu je používán program Phoretix 2D expression verze 2005.

Odstraněním albuminu se zvýší přehlednost celého spektra a zvýrazní se rozlišení proteinů v oblasti > 30 kDa. Porovnáním jednotlivých proteinových map sledovaných vzorků moči je patrné, že bez přítomnosti inhibitorů proteas dochází k výrazné proteolýze projevující se zvýšeným množstvím proteinů v oblasti 10 kDa a naopak úbytkem proteinů v oblasti 50 kDa.

Byla optimalizována metoda 2D elektroforesy pro vzorky pacientů s nefrotickým syndromem. Zjistili jsme, že metoda odstranění albuminu síranem amonným zlepšila přehlednost proteinového spektra a že proteasy pravděpodobně hrají svou úlohu při degradaci proteinů při tubulárních pochodech.

OXID UHELNATÝ INHIBUJE PROLIFERACI KARCINOMU PANKREATU

Autoři : Jaroslav Zelenka, 2. r. PGS, Zdeněk Knejzlík, Martin Leníček, František Šmíd, Tomáš Ruml, Roberto Motterlini a Libor Vítek
Školitel: doc. MUDr. Libor Vítek, PhD., MBA., Hepatologická laboratoř, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Oxid uhelnatý (CO) byl donedávna považován pouze za toxický odpadní produkt degradace hemu. Současné výzkumy však ukazují, že je významnou informační molekulou s velkým terapeutickým potenciálem, především u kardiovaskulárních nemocí. Účelem této studie bylo prozkoumat vliv CO na proliferaci lidského adenokarcinomu pankreatu.

Metodika: Ve studii byly použity buněčné linie lidského adenokarcinomu pankreatu BxPC3 (*in vitro*) a CAPAN-2 (*in vitro* a *in vivo*). Jako zdroj CO byla použita substance uvolňující oxid uhelnatý (CORM-2) a jako kontrola její inaktivní analog (iCORM-2). V *in vitro* studii byla sledována inhibice proliferace tkáňových kultur substancí CORM-2. V *in vivo* studii byly athymickým (nu/nu) myším xenotransplantovány buňky CAPAN-2 a následně byly myším denně i.p. injekcí podávány CORM-2, nebo iCORM-2. Bylo sledováno přežívání myši a růst nádorů.

Výsledky: CORM-2 (20-200 uM) inhiboval proliferaci buněk karcinomu pankreatu (*in vitro*), a to úměrně podané dávce. V *in vivo* studii, myši, které dostávaly CORM-2, přežily významně déle než ty, které dostávaly iCORM-2 (37,7 dní vs 17,2 dní, p=0,002). Objemy nádorů myši léčených látkou CORM-2 byly navíc významně menší než nádory myši s iCORM-2, nebo kontrolních myši (0,038 vs. 0,087 cm³, p=0,008, resp. vs. 0,512 cm³, p=0,001).

Závěr: Oxid uhelnatý uvolňovaný z CORM-2 významně inhibuje proliferaci lidských buněk karcinomu pankreatu *in vitro* i *in vivo* a prodlužuje dobu přežívání myši s implantovaným modelem karcinomu.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ POSTERY

BDE
ERT



ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY

- Aster Viktor, MUDr.
- Bošanská Lenka, MUDr., 1. r. PGS
- Bysterská Petra, Mgr., 2. r. PGS
- Čada Zdeněk, MUDr., 1. r. PGS
- Čížek Zdeněk, 3. r. PGS
- Dudek Michal, MUDr., 1. r. PGS
- Dvořák Luboš, MUDr., 5. r. PGS
- Fábín Petr, Mgr., 2. r. PGS
- Glierová Hana, Mgr., 2. r. PGS
- Holdis Jiří, MUDr., Mgr., 2. r. PGS
- Kalmárová Markéta, Mgr., 5. r. PGS
- Kastner Jan, MUDr., 1. r. PGS
- Kettnerová Martina, MUDr., 2. r. PGS
- Kokavec Juraj, Mgr., 1. r. PGS
- Lačňák Zdeněk, MUDr., 2. r. PGS
- Linetskiy Igor, D.M., 2. r. PGS
- Lišková Jana, Mgr., 3. r. PGS
- Macášek Jaroslav, MUDr., 1. r. PGS
- Nawka Alexander, MUDr., 1. r. PGS
- Otčenášková Martina, Mgr., 1. r. PGS
- Pavlíček Alexandr, 2. r. PGS
- Prokopcová Jana, Mgr., 2. r. PGS
- Sedlář Martin, MUDr., 2. r. PGS
- Scholzová Eva, Ing., 3. r. PGS
- Šulová Martina, Mgr., 2. r. PGS
- Trča Stanislav, MUDr., 5. r. PGS

HODNOTITELSKÁ KOMISE

předseda: **prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.**

členové: doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.

doc. MUDr. Pavel Maruna, CSc.

**VIRUS GBV-C/HGV****Autoři:** Viktor Aster, Jaroslav König, Marie Staňková, Hanuš Rozsypal**Školitelka:** doc. MUDr. Marie Staňková, CSc., III. klinika infekčních a tropických nemocí 1. LF UK a FN Na Bulovce

Úvod: Virus GBV-C/HGV dle současných poznatků nemá vztah s patologickým postižením jater, ledvin, kostní dřeně, či jiného orgánu. V posledních letech jsou publikovány studie o možném benefičním vlivu koinfekce virem GBV-C/HGV u HIV infikovaných osob na vývoj HIV nemoci. Naším cílem bylo stanovení prevalence GBV-C/HGV (dále jen HGV) infekce u HIV pozitivních pacientů a zjišťování možného vlivu HGV na průběh infekce HIV stanovením imunologických a virologických markerů progresu HIV infekce.

Metodika: V roce 2003 až 2005 jsme vyšetřili séra u 329 HIV pozitivních pacientů z AIDS-centra FN Na Bulovce Praha na přítomnost markerů HGV infekce semikvantitativním stanovením HGV RNA metodou PCR a anti-E2 protilátek metodou ELISA. Pacienti byli vyšetřováni v půlročních intervalech. 217 pacientů bylo vyšetřeno 3x, 263 2x a 329 1x. V den odběru byla zjišťována HIV virémie a počet CD4 lymfocytů. Závislost počtu CD4 lymfocytů a virové nálože HIV na infekci virem HGV jsme zjišťovali statistickými metodami.

Výsledky: Z 329 HIV pozitivních pacientů mělo v prvoodběrech 107 (32,5 %) pozitivní test na přítomnost HGV RNA, test na přítomnost anti-HGV protilátek byl v pozitivní u 123 (37,4 %) a 12 (3,6 %) pacientů mělo oba markery pozitivní. Byla prokázána pozitivní závislost ln (počtu CD4 lymfocytů) na virémii HGV ($P=0,02$) i na přítomnosti anti-HGV protilátek ($P<0,001$). U pacientů bez HAART terapie byla prokázána pozitivní závislost na ln (počtu CD4 lymfocytů) na přítomnosti viru HGV. Závislost virémie HIV na virémii HGV, či na hladině protilátek anti-HGV prokázána nebyla.

Závěr: Prevalence infekce HGV u HIV pozitivních pacientů z AIDS-Centra Praha je vyšší než v běžné populaci ČR. Vliv HGV infekce na virovou nálož HIV v naší studii nebyl prokázán. Pacienti s recentní nebo anamnestickou HGV infekcí měli vyšší počty CD4 lymfocytů. Tato závislost byla významnější u pacientů bez HAART terapie. Výsledky našeho sledování jsou obdobné s výsledky studií, poukazujících na benefiční vliv HGV infekce ve vztahu k počtům CD4 lymfocytů u HIV infikovaných.

VLIV PPAR- α AGONISTU NA INZULINOVOU SENZITIVITU**Autoři:** Bošanská L., 1. r. PGS, Anderlová K., Doležalová R., Housová J., Jahodová J., Pavlovičová R., Škrha J. a Haluzík M.**Školitel:** doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc., III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Podávání fibrátů v experimentálních studiích zlepšilo inzulínovou senzitivitu, u lidí jednoznačný efekt nebyl prokázán. Cílem studie bylo objasnit vliv 3-měsíčního užívání agonisty PPAR- α – fenofibrátu (200mg/den) na inzulínovou senzitivitu měřenou pomocí hyperinzulinemického-izoglykemického clampu u obézních pacientek s DM 2. typu. Sledován byl také vztah adipocytárních hormonů adiponektinu a resistinu k metabolickým účinkům fenofibrátu.

Obézní ženy s DM 2. typu na dietě nebo perorálních antidiabetikách měly před i po léčbě fenofibrátem ve srovnání s kontrolní skupinou významně vyšší BMI, hladiny glykémie, triglyceridů, glykovaného hemoglobinu a aterogenní index, ale nižší HDL-cholesterol a koncentrace adiponektinu. Podávání fenofibrátu vedlo k významnému poklesu hladin triglyceridů ($3,12\pm 0,50$ vs. $2,07\pm 0,3$ mmol/l, $p<0,05$); ostatní parametry včetně sérových koncentrací adiponektinu a resistinu zůstaly nezměněny ($13,75\pm 1,71$ vs. $12,95\pm 1,59$ mg/ml, $p>0,05$; $5,25\pm 0,78$ ng/ml vs. $5,6\pm 1,00$ ng/ml, $p>0,05$). Inzulínová senzitivita u pacientek s DM byla před začátkem léčby nižší než u kontrolní skupiny zdravých žen. Po 3měsíčním podávání fenofibrátu byla zaznamenána u obézních pacientek s diabetem tendence ke zvýšení inzulínové senzitivity měřené hyperinzulinemickým clampem. Z vypočítaných parametrů inzulínové senzitivity došlo k signifikantnímu zvýšení indexu M (spotřeba glukózy) a M_{korig} (spotřeba glukózy korigovaná ztrátami inzulínu) ($3,43\pm 0,68$ vs. $4,20\pm 0,70$ mg.kg⁻¹.min⁻¹, $p<0,05$; $3,43\pm 0,62$ vs. $4,20\pm 0,77$ mg.kg⁻¹.min⁻¹, $p<0,05$). Ostatní parametry (MCR, M/I a MCR/I) se významně nezměnily.

V naší studii tedy 3měsíční podávání fenofibrátu u pacientek s DM 2. typu a obezitou nevedlo k přesvědčivému zlepšení inzulínové senzitivity ani k významnému ovlivnění endokrinní funkce tukové tkáně.

Podporováno grantem IGA 8302-5 a VZ MŠM 0021620814.

THE EFFECT OF IMMUNOSUPPRESSANTS ON NON-SPECIFIC IMMUNITY CELLS FOLLOWING KERATOPLASTY IN MICE**Author:** Mgr. Petra Bysterská, 2. r. PGS**Tutor:** prof. Dr. Hassan Farghali DrSc., Institute of Pharmacology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, MUDr. Petra Svozílková Ph.D., Institute of Pharmacology, Department of Ophthalmology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Background: To evaluate the efficacy of FK506, mycophenolate mofetil (MMF) and aminoguanidine (AG) on macrophage and neutrophil infiltration and on prevention of graft rejection following keratoplasty in mice (Tx). Materials and methods: Tx in mice (C57BL/10 to BALB/c) was performed. Therapy included FK506 (0.2 mg/kg), MMF (30 mg/kg) or AG (0.1 g/kg), started at the day of Tx and was injected i.p. for 8 weeks. Corneas were excised on the 3rd and 7th day after Tx and on the day of rejection. Immunohistological evaluation using antibodies against macrophages, neutrophils and

iNOS was performed. Results: On the 3rd day after Tx, a massive infiltration of macrophages and neutrophils into corneal grafts was revealed in controls. Treatment with FK506 or MMF led to a decrease of neutrophils, but not macrophages. In contrast, AG reduced macrophage migration into allografts, whereas neutrophil infiltration has not been attenuated on the 3rd day after Tx. On the 7th day, there was higher number of cells in all treated groups compared with controls. Conclusions: During rejection, FK506 or MMF reduced neutrophil infiltration, whereas AG decreased the number of macrophages. FK506 significantly inhibited iNOS expression in rejected grafts. Within the first two weeks after Tx a significant reduction of relative risk (RR) of rejection was observed for FK506 (RR 0.15) and MMF (RR 0.28). Preventive effect of FK506 could be observed for at least 29 days, MMF for at least 3 weeks after Tx.

Supported by GACR 305/03/D130 and VZ MSM 0021620807. FK 506 was kindly supplied by Fujisawa GmbH (Germany) and MMF by Roche (Czech Republic). Thanks to Prof. Ivan Raska for giving us the possibility to use the confocal microscopy and to Prof. Martinek.

EXPRESSE GALEKTINŮ V NORMÁLNÍ LIDSKÉ EPIDERMIS, SLIZNICI JAZYKA A Z NICH ODVOZENÝCH NÁDORŮ

Autoři: Zdeněk Čada, 1. r. PGS, Martin Chovanec, Lukáš Lacina, Jan Plzák, Karel Smetana Jr., Hans-Joachim Gabius

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

Úvod: Galektiny jsou endogenní proteiny uplatňující se jako adhezivní a růstové regulátory v biologii nádorů.

Byla provedena srovnávací fenotypová studie hodnotící expresi galektinů -1,-2,-3,-4,-7,-8,-9 za použití imunocytochemických metod a jejich vzájemná komparace v normální lidské epidermis, dlaždicobuněčném epitelu jazyka, bazocelulárním karcinomu a v dlaždicobuněčném nádoru jazyka.

Metodika: Byly připraveny zmrazené řezy vzorků. Galektiny byly detekovány imunocytochemickými metodami. Výsledky byly zpracovány počítačovou analýzou za pomoci programu LUCIA.

Výsledky: Expresse jednotlivých galektinů byla závislá na typu studovaného epitelu a nádoru. Za jeden z významných nálezů považujeme expresi galektinu -1 ve všech vrstvách epitelů jazyka nikoliv v epidermis. Expresse galektinu -9 byla detekována v aktivně proliferujících basálních buňkách obou typů dlaždicobuněčných epitelů. U bazocelulárních karcinomů došlo k výrazné redukci všech studovaných typů galektinů. U spinocelulárních karcinomů nebyl tento nález tak markantní.

Závěr: Fenotypová analýza galektinů objevuje zřejmé tumor asociující exprese využitelné v dalších klinických studiích.

Tato studie byla podpořena grantovým projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy No. MSM0021620806 a No. 1M0021620803, GAČR 304/04/0171, MZ ČR No. NR/9049-3.

ÚČINEK KYSELINY ETHAKRYNOVÉ NA RŮST VIRU VAKCÍNIE

Autoři: Zdeněk Čížek, 3. r. PGS, Martin Vokurka, Zora Mělková

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

Virus vakcinie (VV) byl v minulosti využíván k úspěšnému očkování proti černým neštovicím, způsobeným příbuznou variolou. Roku 1980 byla tato vysoce nakažlivá nemoc prohlášena za vyhlazenou, nicméně z obav před bioterorismem se v současnosti začíná s očkováním vybraných skupin populace znovu. Očkování vakcínou, obsahující živý virus vakcinie, má řadu nežádoucích reakcí, a to včetně vzácných, za to však těžkých až smrtelných komplikací. Z těchto důvodů je třeba hledat nové látky obecně účinné proti poxviróvé infekci.

V naší laboratoři jsme pozorovali inhibiční efekty kyseliny ethakrynové (EA) na růst VV v buněčné linii HeLa G. V návaznosti na předchozí pokusy pokračujeme v analýze účinku EA. Zkoumáme vliv EA na růstový cyklus VV a na expresi virových proteinů v různých časových intervalech. Účinek EA studujeme také in vivo na myších.

Z našich výsledků vyplývá, že zvyšující se koncentrace EA inhibuje růst viru vakcinie, a to 5 μ M 10x a 10 μ M 100x. Western blot analýza ukázala, že tato inhibice je spojena se sníženou expresí virových proteinů. Kvalitativní zastoupení proteinů VV se zdá být srovnatelné s neinhibovanou expresí a pokusy s inhibitory DNA syntézy hydroxyureou a cytosin arabinosidem naznačují, že EA neinhibuje expresi pozdních proteinů VV.

Dávku, která by při distribučním prostoru myši měla zajistit účinnou koncentraci EA v organismu, lze jednoduše aplikovat intraperitoneálně či subkutánně. Avšak vzhledem ke kinetice vylučování EA ledvinami je nutno tuto aplikaci v několikahodinových intervalech opakovat. Při aplikaci 8,5–11,4 mg EA/kg v 6hodinových intervalech jsou nežádoucí účinky v podobě zvýšené diurézy po dobu 2 dnů zvládnutelné. EA či některý její derivát se tak jeví jako potencionálně využitelný k léčbě postvakcinačních komplikací při očkování virem vakcinie u lidí.

VLIV KOROZNÍHO PROSTŘEDÍ NA PEVNOST VAZBY MEZI DENTINEM A KOMPOZITNÍMI VÝPLŇOVÝMI MATERIÁLY

Autoři: Michal Dudek, 1. r. PGS, Pavel Bradna

Školitelé: RNDr. Pavel Bradna, CSc., MUDr. Jarmila Procházková, CSc., Výzkumný ústav stomatologický 1. LF a VFN

Úvod: Odolnost adhezivního spoje mezi tvrdými zubními tkáněmi a výplňovými kompozity je klíčová pro dlouhodobě úspěšné ošetření těmito moderními materiály. V současné době se objevují nové adhezivní systémy nabízející zjednodušený pracovní postup, ovšem jejich spolehlivost není ověřena dlouhodobými laboratorními a klinickými zkouškami za různých podmínek. Naším cílem bylo porovnat odolnost adhezivního spoje několika odlišných typů adhezivních systémů v roztoku 1,5 % laurylsíranu sodného obsaženého v zubních pastách, modelového dezinfekčního roztoku Corsodyl s obsahem 0,2 % chlorhexidinu, ústní vody Elmex obsahující 0,025 % F a destilované vodě (kontrolní skupina) při expozici po dobu 2 měsíců a teplotě 37°C.

Metodika: Testovány byly adhezivní systémy GLUMA COMFORT BOND s pracovním postupem ve dvou krocích (zvlášť leptání, priming a bonding společně) a iBOND (leptání-priming-bonding v jednom kroku). Pro každé prostředí bylo připraveno 10 vzorků od každého adhezivního systému (celkem 80 zubů). Použity byly intaktní moláry a premoláry, u nichž po odstranění skloviny byla pomocí adhezivních systémů zhotovena výplň z kompozitního materiálu CHARISMA (vše Heraeus Kulzer). Po skončení expozice byla změřena pevnost vazby ve smyku, vyjádřená v (MPa). Výsledky byly statisticky zpracovány metodou analýzy rozptylu ANOVA a Tukeyho post-hoc testem $p=0,05$. Dále byl pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu hodnocen charakter lomu.

Výsledky: Po dvouměsíční expozici ve vodě byly největší hodnoty pevnosti a nejvyšší podíl kohezivních lomů, svědčících o velmi dobré adhezi, nalezeny u systému Gluma Comfort Bond v destilované vodě. U tohoto adhezivního systému však došlo v prostředí fluoridačního roztoku ke statisticky významnému poklesu pevnosti vazby (24 -> 18 MPa) oproti kontrolní skupině. V ostatních prostředích a u adheziva iBond nebyly nalezeny statisticky významné změny pevnosti vazby po expozici a četností v zastoupení jednotlivých typů lomů.

Závěr: Pokles pevnosti adhezivního spoje ve fluoridačním roztoku ukazuje na možnost chemické degradace adheziv v tomto prostředí.

OCHRANA MYOKARDU LEUKOCYTÁRNÍ FILTRACÍ PŘI SRDEČNÍ TRANSPLANTACI: VÝSLEDKY KLINICKÉ STUDIE

Autoři: Luboš Dvořák, Jan Pirk, Štěpán Černý, Eva Honsová, Jan Kovář, Bronislav Janek

Školitel: prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc., Klinika kardiiovaskulární chirurgie, IKEM Praha

Úvod: Při transplantaci srdce (TxS) dochází k reperfuznímu poškození dárcovského myokardu aktivovanými neutrofily. V této práci jsme hodnotili vliv použití leukocytárních filtrů (LF) při reperfuzi dárcovského myokardu na krátkodobé a střednědobé výsledky TxS a porovnávali tuto metodu myokardiální ochrany s technikou prosté sekundární krevní kardioplegie (SKK).

Metodika: V prospektivní klinické studii jsme randomizovali 40 pacientů indikovaných k TxS do skupiny s použitím LF ($n = 20$), zařazených v mimotělním oběhu a okruhu SKK, a do kontrolní skupiny ($n = 20$) s použitím pouze techniky SKK. K ověření efektivnosti LF jsme analyzovali peroperačně krevní obraz, markery myokardiálního poškození (CK-MB, troponin B2, troponin I, laktát), biopsie myokardu, uvolněné endotelie (CD 62E), obnovení rytmu a zotavení štěpu. V pooperačním průběhu jsme monitorovali CK-MB, hemodynamické hodnoty, dávky inotropik a řadu dalších klinických ukazatelů. V rámci dlouhodobého pooperačního sledování jsme hodnotili endomyokardiální biopsie a ultrazvukové vyšetření srdce a koronárních tepen.

Výsledky: Ve skupině s LF jsme v porovnání s kontrolní skupinou pozorovali zejména příznivější ultrastrukturální poškození myokardu, nižší markery reperfuzního poškození, kvalitnější zotavení a fungování štěpu, příznivější pooperační klinický průběh, i menší výskyt rejekčních epizod v potransplantačním období. Žádný ze sledovaných parametrů nnesvědčil významně v neprospěch skupiny s LF.

Závěr: Výsledky studie potvrzují předpokládaný příznivý vliv leukocytární filtrace při reperfuzi srdečního štěpu na ischemicko-reperfuzní poškození myokardu. Leukocytární filtrace je efektivní, bezpečná a jednoduchá metoda ochrany myokardu, která zmírňuje následky reperfuzního poškození a zlepšuje tak krátkodobé i střednědobé výsledky TxS. Rutinní a systematické používání LF během TxS umožní posoudit dlouhodobý prospěch pro pacienty.

Tato práce je realizována v rámci grantového projektu č. 036IGA MZ ČR.

KARDIORESPIRAČNÍ ZDATNOST U STARŠÍHO CYKLISTY 14 LET PO ZÁVAŽNÉM POLYTRAUMATU

Autoři: MUDr. Zdeněk Lačňák, 2. r. PGS, Mgr. Petr Fábín, 2. r. PGS

Školitel: doc. MUDr. Zdeněk Vilikus, CSc., Ústav tělovýchovného lékařství 1. LF a VFN

Úvod: 58letý cyklista prodělal při cyklistickém závodě před 14 lety těžké polytrauma. Mimo jiné utrpěl hemoragický šok, oboustrannou kontuzi hrudníku se sériovou zlomeninou osmi žeber a kontuzi plic s pravostranným hemithoraxem

a oboustrannou dorzobazilární atelektázou. Po ukončení rehabilitace pacient navázal na svoji předchozí cyklistickou sportovní aktivitu. Cyklistice se věnuje od doby úrazu 12 let s průměrným objemem 2–4 hodiny 4x týdně, s průměrnou intenzitou desetinásobku klidového metabolismu (rychlost 23–26 km/hod, 10 METs), jeho energetický výdej podle kvalifikovaného odhadu (Ainsworthová 1993) věnovaný sportu činí 58 tisíc kJ týdně.

Metodika: U pacienta jsme provedli komplexní vyšetření zahrnující spirometrii s flow-volumem a spiroergometrii do vita maxima na automatickém analyzátoru Oxycon Delta.

Výsledky: Následkem zranění dosud přetrvává středně těžká restriční ventilační porucha s VC_{EX} 53 % a VC_{IN} 45% náležité hodnoty. Při maximální zátěži dosáhl sportovec plicní ventilace 95 l/min (100% náležité hodnoty) při dechové frekvenci 52/min a dechovém objemu 1,83 l (63% VC_{EX}). Ukazatel maximální aerobní kapacity ($VO_{2max}/kg = 46,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) činil 147 % (!) náležité hodnoty pro muže české populace stejného věku (Seliger 1976, Vilikus 1999). Ventilační ekvivalent pro kyslík dosáhl hodnoty 24,6 (84 % ref. hodnoty).

Diskuse: Snížená vitální kapacita a nízký dechový objem byly kompenzovány vyšší dechovou frekvencí, takže plicní ventilace při maximální zátěži dosáhla 100 % referenční hodnoty. Vysoká aerobní kapacita pracujících kosterních svalů umožnila efektivnější využití ventilovaného vzduchu, o čemž svědčí velmi nízká hodnota ventilačního ekvivalentu.

Závěr: Posttraumatická těžká restriční ventilační porucha může být úspěšně kompenzována vysokou aerobní kapacitou získanou díky vytrvalostní sportovní aktivitě.

ÚLOHA BUNĚČNÉHO PRIONOVÉHO PROTEINU V ERYTROPOÉZE

Autoři: Glierová H., 2. r. PGS, Panigaj M., Živný J.*, Holada K., Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK, Praha,* Ústav patologie a fyziologie, 1. LF UK Praha

Školitel: Dr. Ing. Karel Holada, Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK

Priony způsobují skupinu smrtelných neurodegenerativních onemocnění zvaných transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE). Jedním z potenciálních markerů TSE je α -hemoglobin stabilizující protein (AHSP) exprimovaný na erytroidních buňkách. Jeho fyziologickou funkcí je vazba na α -globinové podjednotky, čímž brání jejich precipitaci. V průběhu prionového onemocnění je exprese AHSP snižována, což naznačuje souvislost mezi erytropoézou a TSE.

Abychom zjistili úlohu PrPc v erytropoéze, indukovali jsme akutní hemolytickou anémii pomocí phenylhydrazinu (PHZ) podaného i.p. myším s normální expresí PrPc (WT) a myším neexprimujícím PrPc (Prnp -/-). Po počátečním poklesu hematokritu u WT a Prnp-/- došlo ke zvýšení exprese mRNA pro erythropoetin (EPO) v ledvinách, s čímž koreluje zvýšení hladiny cirkulujícího EPO. Návrat hematokritu k normálu byl u Prnp-/- signifikantně zpomalený. K ověření role prionového proteinu jsme porovnali Prnp-/- a Tga20 se zpětně vloženým genem pro PrPc. Expres PrPc u Tga20 myši vedla ke zlepšení průběhu anémie vyvolané fenylhydrazinem. Toto pozorování nasvědčuje nižší schopnosti Prnp-/- myši vyrovnávat se s oxidačním stresem, ke kterému dochází vlivem působení phenylhydrazinu. Naše výsledky naznačují, že PrPc hraje roli v procesu erytropoézy.

GAČR 310/04/0419, GAČR 310/05/H533

GLYCOGENOLYTIC RESPONSE TO GLUCAGON AND ADRENERGIC AGONISTS IN HEPATOCYTE CULTURE: POSSIBLE INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE SIGNALING

Authors: Jiří Hodis¹, 2. r. PGS, Petr Potměšil², Eva Kmoníčková², Zdeněk Zídek², Hassan Farghali¹

Školitel: prof. Dr. Hassan Farghali¹ ¹Institute of Pharmacology; ^{1st} Faculty of Medicine, Charles University; ²Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences Prague, Czech Republic

Background: Glucagon and epinephrine raise the cAMP level that activates protein kinase A leading to the activation of phosphorylase and glycogen breakdown. The role of nitric oxide (NO) in this process is not extensively studied. In the present work, we sought to investigate whether NO is produced during glucagon – or adrenoceptor agonist – induced glycogenolysis in rat hepatocytes in culture.

Materials and Methods: Isolated rat hepatocyte cultures (glycogen rich) were used. NO production (NO_2^-) was assessed under the effect of adrenergic agonists, glucagon, and adrenergic agonist/antagonist pairs, nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. (iNOS) mRNA was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Glycogenolysis was followed up by estimation of medium glucose levels.

Results: Glucose and NO_2^- released by glycogen-rich hepatocytes was increased as a result of glucagon, epinephrine or phenylephrine treatments. The increase in glucose and NO_2^- released by epinephrine or phenylephrine was blocked or reduced by prazosin pretreatment and by NOS inhibitors aminoguanidine and N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). iNOS gene expression was upregulated by both glucagon and epinephrine and was partially reduced by L-NAME.

Conclusions: Glycogenolysis occurs through adrenoceptor or glucagon receptor stimulation signaling cascade may involve NO production downstream of receptor- cAMP pathways. The Glycogenolytic response to glucagon and adrenergic agonists in rat hepatocyte culture with possible involvement of NO signaling is documented in the present study.

Supported by grant IGA MZ NL/7418-3.



NUCLEOLAR ASSOCIATION OF THE NOR-BEARING CHROMOSOMES

Authors: M. Kalmárová, 5. r. PGS, E. Smirnov, K. Koberna, M. Mašata, I. Raška
Školitel: prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., Ústav buněčné biologie a patologie, LF UK a Oddělení buněčné biologie, Fyziologický ústav Akademie věd ČR

It is widely accepted that chromosomes occupy more or less fixed positions in mammalian interphase nucleus. It remains unclear, however, how the large-scale order of chromosome positioning depends on the transcription activity of various genes. We used the model of the ribosomal genes (coding 18S, 5.8S and 28S rRNA) to address this problem. Ribosomal genes are organized in clusters termed nucleolus organizer regions (NORs). Only some NORs are transcribed, and termed competent, while the rest remain silent. There is no doubt that active ribosomal genes are located in cell nucleolus. But how is this activity reflected in the positioning of the whole chromosomes bearing active and inactive NORs? In this respect, we show that chromosomes with competent NORs are much more frequently associated with nucleoli, and located closer to each other, than the chromosomes with silent NORs. These data indicate that the activity of NORs may contribute to chromosomal arrangement. This work was supported by grants AV0Z50110509, MSM0021620806, LC535 and WT07583.

FRAGMENT ANALYSIS OF AMPLIFIED REGION 3Q25.31-3Q28 IN HNSCC

Author: Jan Kastner, 1. r. PGS
Tutors: prof. MUDr. Jan Betka, DrSc., Klinika ORL a Chirurgie Hlavy a Krku 1. LF UK, FN Motol, prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Amplification of chromosome 3q has been implicated to contribute to the genesis of HNSCC. Here we targeted the question if early (small) chromosomal changes are detectable in the tumor and macroscopically normal surrounding mucosa by fragment analysis. Therefore we conducted fragment analysis of chromosomal region 3q26 and surrounding regions. From twenty patients biopsies of the primary tumors and adjacent mucosa and at 1cm and 2cm from the tumor border have been collected. Eleven microsatellite markers at loci 3q25.31-3q28 have been amplified and analysed by capillary electrophoresis. We confirmed high ratios of gains in the samples as previously observed by CGH, which we called in analogy to losses, GOH (gain of heterozygosity or amplification of one microsatellite allele). We found GOH in tumor samples as well as high ratios of GOH (up to one third of all informative allelotypes) in adjacent macro- and microscopically normal mucosa. This indicates that the term „molecular dysplasia“ should be introduced for preneoplastic processes which are not detectable by conventional histopathological examination. As we detected by fragment analysis small aberrations in noncancerous (dysplastic or normal) mucosa adjacent to the tumor, we propose that these loci harbor one or more oncogenes which might be relevant in early carcinogenesis in HNSCC. Our data suggest further molecular studies to identify mechanisms of early carcinogenesis in HNSCC.

KMENY NEISSERIA MENINGITIDIS, IZOLOVANÉ OD PACIENTŮ S INVAZIVNÍ MENINGOKOKOVOU INFEKČÍ SE LIŠÍ VE STIMULACI CYTOKINOVÉ PRODUKCE IN VITRO

Autor: MUDr. Martina Kettnerová, 2. r. PGS
Školitel: doc. MUDr. Michal Holub, PhD. III. klinika infekčních a tropických nemocí, 1. LF a FN Na Bulovce

Úvod: Navzdory možností efektivní antimikrobiální terapie je invazivní onemocnění vyvolané bakterií *Neisseria meningitidis* (NM) stále život ohrožující infekcí. Opakovaně bylo prokázáno, že tíže průběhu invazivního meningokokového onemocnění (IMO) koreluje s koncentrací zánětlivých cytokinů v séru i s virulencí bakterie [1]. Cílem studie bylo zhodnotit schopnost kmenů NM, izolovaných od nemocných s různou tíží IMO, stimulovat produkci cytokinů v krvi zdravých dárců.

Metodika: V modelu periferní lidské krve jsme testovali tři kmeny NM: virulentní kmen izolovaný od pacienta s lehkým průběhem IMO a dva hypervirulentní kmeny, získané od pacientů se středně těžkým a smrtelným průběhem IMO. Po inkubaci krevních vzorků s NM jsme analyzovali extracelulární produkci cytokinů pomocí průtokové cytometrie a současně jsme hodnotili i procento monocytů s intracelulární produkcí cytokinů.

Výsledky: Koncentrace IL-1 β , IL-6 a TNF- α byla signifikantně vyšší po stimulaci virulentním kmenem NM ve srovnání s oběma hypervirulentními kmeny ($p < 0.01$), mezi nimiž byl také signifikantní rozdíl ($p < 0.01$). Naopak u nemocných, od kterých byly testované kmeny NM izolovány, byly nevyšší sérové koncentrace cytokinů zjištěny u pacientky s fatálním průběhem IMO vyvolaným hypervirulentním kmenem NM a nejnižší u pacienta s příznivým průběhem infekce, vyvolané virulentní bakterií. Ve stimulaci produkce IL-8 a IL-12 jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly.

Závěr: Výsledky studie naznačují, že stimulace cytokinové produkce kmeny NM se liší v závislosti na genotypu a fenotypu bakterie. Virulence NM hraje pravděpodobně v nadměrné aktivaci imunitní odpovědi pouze sekundární roli a lze se domnívat, že hlavním faktorem v rozvoji excesivní imunitní reakce při IMO je genetická výbava pacienta.

Studie je podporována grantem IGA NR 8014/3 a grantem GA ČR 310/05/H533.

Literatura:

1. Deuren MD, Brandtzaeg P, Meer JWM. *Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management.* Clin Microbiol Rev 2000;13:144-166

MYŠÍ MODEL KONDICIONÁLNEJ INAKTIVÁCIE CHROMATÍN REMODELAČNÉHO FAKTORU SNF2H

Autor: Mgr. Juraj Kokavec, 1. r. PGS

Školiteľ: MUDr. Tomáš Stopka Ph.D., Ústav patologické fyziologie 1. LF UK

Štruktúra chromatinu je riadená a udržiavaná DNA-viažúcimi enzýmami s helikázovou aktivitou, ktoré využívajú energiu ATP menia asociáciu DNA s histónovým jadrom nukleozómu. Doteraz sú známe štyri rodiny chromatin remodelačných enzýmov: ISWI, SWI/SNF, CHD a INO80, ktoré sú charakteristické štruktúrou N-terminálnej (*ATP-viažúce miesto a DEXH-box*) a C-terminálnej (*SNF2/RAD54 homológia*) helikázovej domény. Chromatín remodelačný proteín Snf2h z helikázovej podrodiny ISWI (*Imitation SWITCh*) je nepostrádateľným faktorom diferenciácie a líniovej determinácie hematopoietických buniek a tiež regulácie skorého embryonálneho vývinu. Recentne sme vytvorili myši knock-out (KO) model génu *Snf2h*, ktorý mal deletované exóny 5 až 9 zahŕňajúce celú N-terminálnu helikázovú doménu. Ako sa ukázalo, myšie embryá homozygotné pre deletovanú alelu umierali skoro počas periimplantačného obdobia následkom zástavy proliferácie a apoptózy kmeňových buniek embrya. Najnovšie štúdie ukázali, že proteín Snf2h špecificky viaže kľúčové hematopoietické transkripčné faktory GATA-1 a PU.1, mutované v akútnej leukemii.

Naším hlavným cieľom je študovať úlohu Snf2h v krvotvorbe a leukemogenéze, a preto sme pripravili tri kondicionálne KO konštrukty deletujúce exóny N-terminálnej helikázovej domény. Konštrukty obsahujú časti génu *Snf2h*, gény pre Flp rekombinázu, neomycínovú rezistenciu (PGK-Neo^R), tymidín kinázu (HSV-TK) a ďalej obsahujú loxP a frr miesta nevyhnutné pre Cre-závislú deléciu *Snf2h*, respektíve pre Flp-závislú excíziu PGK-Neo^R. Konštrukty sú v súčasnosti transfekované do embryonálnych kmeňových (ES) buniek selektovaných G418 na prítomnosť neomycínovej kazety ako dôkaz integrácie do genómu. Bunky ďalej podliehajú negatívnej selekcii gancyclovirom na zamedzenie náhodnej integrácie konštruktu. ES bunky sa použijú na generovanie mutantných myšičích KO klonov metódou mikroinjekcií do myšičích blastocýst, ktorá je v súčasnosti v našom laboratóriu zavádzaná. Križenie myšičích exprimujúcich Cre-rekombinázu pod rôznymi hematopoietickými promotormi s našimi mutantnými KO líniami povedie ku produkcii myšičích klonov s mutáciami *Snf2h* v hematopoietických bunkových líniiach. NR9021-4, 301/06/093, LC06044.

VÝZNAM ARTEFAKTŮ ZPŮSOBENÝCH DENTÁLNÍMI SLITINAMI BĚHEM VYŠETŘENÍ METODOU MAGNETICKÉ REZONANCE

Autoři: Linetskiy I., 2. r. PGS, Hubálková H., Krupa P., Dostálová T.

Školitelka: MUDr. Hana Hubálková, Ph.D., Stomatologická klinika 1. LF a VFN

Artefakty (deformace výsledného obrazu) vznikající při vyšetření metodou magnetické rezonance (MR) mohou být způsobeny různými faktory. V oblasti hlavy a krku významné artefakty vznikají v důsledku interakce kovových těles s vysokofrekvenčním magnetickým polem MR přístroje. Velikost a tvar artefaktů je přímo závislá na magnetických vlastnostech přítomných kovů, ze kterých se zhotovují fixní protetické práce, dentální implantáty, chirurgické dlahy, fixní ortodontické aparáty a další. Kvalita obrazu vyšetřované oblasti může být porušena jeho deformací, výpadkem zobrazovaného pole (podoba „černé díry“) nebo oběma mechanismy. Klinický význam artefaktů představuje možnou chybnou interpretaci výsledků vyšetření: stanovení nepřesné až chybné diagnózy, případně nemožnost vyhodnocení výsledků pro ztrátu obrazu. Přítomné artefakty mohou zkreslit diagnostiku, průběh a kontrolu léčby u pacientů s onkologickými onemocněními, v pouřazových stavech, při poruchách TMK, u vývojových anomálií. Na výsledcích MR měření vybraných slitin in vitro a na kazuistických sděleních autoři hodnotí artefakty v závislosti na chemickém složení slitin.

INHIBICE SUPERINFEKCE PŘI INFEKCI BUŇKY VIREM VAKCINIE

Autorky: Jana Lišková, 3. r. PGS, Zora Mělková

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

Je obecně uznávaným faktem, že při virové infekci je následná infekce téže buňky dalším virem inhibována. I v případě infekce virem vakcinie bylo popsáno, že buňku již jednou infikovanou nelze po určitém čase infikovat podruhé. Naše výsledky však ukazují, že kritický interval bloku superinfekce zřejmě začíná později, než bylo publikováno.

Epiteliální buňky BSC 40 byly infikovány v čase 0 rekombinantním virem vakcinie kmene WR exprimujícím RFP (červený fluorescenční protein). Superinfekce byla provedena rekombinantním virem exprimujícím GFP (zelený fluorescenční protein) v časech 4 nebo 10 hodin po první infekci. Výsledná červená a zelená fluorescence infikovaných buněk byla hodnocena pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie v čase 24 hodin po první infekci. V časovém intervalu 4 hodiny po infekci k superinfekci docházelo, významné procento buněk měřených průtokovou cytometrií vykazovalo červenou i zelenou fluorescenci. Tento výsledek byl potvrzen i fluorescenční mikroskopii. V časovém intervalu 10 hodin po infekci však byla superinfekce již blokována, což bylo ověřeno oběma metodami. Průběh a blok superinfekce byl závislý na experimentálních podmínkách, zejména multiplicitě infekce.



Fenomén inhibice superinfekce je známý a detailně prostudovaný u řady virů, u viru vakcinie však není známý jeho mechanismus ani průběh. Superinfekční experimenty dovolující infikovat buňky postupně několika rekombinantními viry by podstatně rozšířily možnosti virologických experimentů a poznatky takto získané by mohly mít význam pro poznání patogeneze virových nákaz. Proto je úkolem do budoucna blíže charakterizovat možnost superinfekce virem vakcinie v dalších intervalech po infekci.

VLIV SKLADOVÁNÍ NA DISTRIBUCI VELIKOSTI ČÁSTIC LIPOPROTEINŮ O NÍZKÉ HUSTOTĚ

Autoři: Jaroslav Macásek, 1. r. PGS, Marie Jirkovská, Eva Tvrzická, Barbora Staňková, Marek Vecka, Aleš Žák
Školitelka: RNDr. Eva Tvrzická, CSc., IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Jednotlivé lipoproteinové třídy (VLDL, IDL, LDL, HDL) separované pomocí ultracentrifugy představují heterogenní směsi částic, které vykazují jistou míru intra – i interindividuální variability. Studium metabolismu lipoproteinů a zpřesňování diagnostiky hyper- a dyslipoproteinemie si vyžaduje stálé zdokonalování laboratorních technik a zavádění nových vyšetřovacích metod. Moderní chromatografické metody v kombinaci s elektronovou mikroskopií, která je absolutní metodou pro stanovení velikosti částic, umožňují i v oblasti intaktních lipoproteinů detailnější studium. Cílem práce bylo sledovat vliv přípravy vzorku a jeho skladování na velikost částic separovaných lipoproteinů o nízké hustotě LDL.

Metodika. Lipoproteiny LDL byly separovány sekvenční preparativní ultracentrifugací (frakce o hustotě <1,063), dialysovány v roztoku o hustotě 1,006, a uskladněny při teplotě +4°C nebo alternativně -20°C. Následně byly zpracovány technikou negativního kontrastu pro elektronovou mikroskopii. Částice byly vyfotografovány při zvětšení 33 333x a dále pomocí stereomikroskopu převedeny do digitální podoby. Velikost částic byla změřena programem Leica IM500 a naměřená data statisticky zpracována.

Výsledky. Velikosti částic LDL za různých podmínek přípravy a skladování jsou uvedeny v tabulce.

nedialysované LDL (n)	průměr(nm)	dialysované LDL (n)	průměr (nm)
ND-Z K030 (204)	21.70 ± 5.73	D-Z K030 (252)	30.68 ± 6.98***
ND-N K030 (219)	20.22 ± 5.98	D-N K030 (300)	33.72 ± 20.57***
ND-Z OT60B (224)	16.77 ± 2.39	D-Z OT60B (204)	23.00 ± 3.47***
ND-N OT60B (238)	16.98 ± 2.43	D-N OT60B (333)	17.52 ± 4.05

*** - P < 0.001, Mann-Whitney U-test

ND= nedialysované, D= dialysované, Z= zmrazené, N= nezrazené

Závěr. Tato pilotní studie ukázala, že u sledovaných vzorků měla dialýza vliv na velikost částic. Dialysované částice měly větší průměr než nedialysované. Důvodem mohou být iontové interakce solného prostředí s lipoproteinovými částicemi či přímo vliv těchto interakcí na konformaci apoproteinů. Velikost zmrazených lipoproteinových částic byla u dvou vzorků větší a jednoho vzorku menší než u nezrazených.

PSYCHIATRICKÁ SYMPTOMATIKA DOBROVOLNĚ I NEDOBROVOLNĚ PŘIJATÝCH PACIENTŮ S PSYCHOTICKOU PORUCHOU, POCIŤUJÍCÍCH OMEZENÍ PŘI PŘIJETÍ, DATA Z MEZINÁRODNÍ STUDIE EUNOMIA

Autoři: Alexander Nawka, 1. r. PGS, Jiří Raboch, Lucie Kuklová, skupina EUNOMIA
Školitel: prof. MUDr. Jiří Raboch, DrSc., Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Cílem mezinárodní studie EUNOMIA je podrobně popsat současné užití omezovacích opatření a prostředků v psychiatrické praxi v jedenácti evropských zemích a Izraeli, výsledky vyhodnotit a pokusit se nabídnout odpovědi na otázky vhodné indikace a aplikace těchto opatření. V České Republice je řešitelem tohoto projektu Psychiatrická klinika 1.LF UK ve spolupráci s PL Bohnice. Psychotická onemocnění patří mezi nejčastější diagnózy u pacientů přijatých nedobrovolně do psychiatrického zařízení a léčených proti své vůli.

Hypotéze: Psychický stav pacientů s psychotickým onemocněním se upravuje lépe ve skupině dobrovolně přijatých vnímajících omezení než u pacientů přijatých nedobrovolně.

Metodika: Sběr dat začal 1. 11. 2002 a skončil 31. 12. 2005. Spádovou oblastí pro náběr pacientů byla Praha 2, 3, 4, 8 a 10 (cca. 450 000 osob). Do projektu byly zařazeni postupně všichni pacienti přijatí na uzavřená psychiatrická oddělení v spádové oblasti s hlavní diagnózou s okruhu schizofrenie dle MKN-10. První skupinu tvořili všichni pacienti přijatí nedobrovolně (N=120), druhou pacienti přijatí dobrovolně, kteří pociťovali při přijetí určité omezení či nátlak (MacArtur – 3 a vícekrát NE), (N=18). Pacienti byly v průběhu studie dotazováni sérií dotazníků ve třech časových obdobích, a to v období T1 – do 7 dnů po přijetí, T2 – měsíc po přijetí a T3 – 3 měsíce po přijetí, bez ohledu na to, zda byli stále hospitalizováni či propuštěni. Sérii dotazníků jsme hodnotili jak psychopatologické symptomy pomocí škály BPRS (24bodová), tak globální zhodnocení závažnosti onemocnění a zhoršení fungování, pomocí škály GAF.

Výsledky: Průměrný věk zúčastněných ve skupině dobrovolných pacientů byl signifikantně nižší 33,0 let, než ve skupině nedobrovolně 39,8 (t-test, p<0,05). Délka hospitalizace je téměř identická u obou srovnávaných skupin, 51,1

dnů u dobrovolných pacientů, proti 51,5 dnům u pacientů nedobrovolných. U nedobrovolných psychotických pacientů došlo k absolutní změně v GAF mezi T1 a T3 celkově o 33,8 bodů, ve skupině pacientů dobrovolných to bylo 25,7 bodů, což není signifikantní rozdíl. Podobně při vyhodnocení dotazníku BPRS, kde absolutní změna mezi T1 a T3 ve skupině dobrovolně léčených pacientů byla 13,1 a ve skupině nedobrovolně léčených 18,4 nedosáhla signifikantního rozdílu.

Závěr: Nedobrovolný vstup sám o sobě a eventuelní užití dalších omezovacích opatření nevedlo u psychotických pacientů k horší spolupráci v době po propuštění, ani k pomalejší úpravě psychopatologických symptomů. Výsledky naší studie tedy nepotvrdili námi stanovenou hypotézu, protože psychický stav pacientů s psychotickým onemocněním se upravil stejně tak ve skupině dobrovolně přijatých pacientů pocítujících omezení při přijetí jako ve skupině nedobrovolně přijatých. Lze tedy konstatovat, že na léčbu psychotických pacientů nemá vliv to, zda-li byly přijaty dobrovolně či nedobrovolně, protože obě skupiny dosáhly stejné míry úzdravy do doby posledního sledování, tj. do tří měsíců po přijetí.

Podpořeno grantem v rámci pátého rámcového programu Evropské Unie č. QLG4-CT-2002-01036.

VLIV INOKULACE PORPHYROMONAS GINGIVALIS NA CYTOKINOVÝ PROFIL HYPER- A NORMOCHOLESTEROLEMICKÝCH POTKANŮ

Autorka: Mgr. Martina Otčenášková, 1. r. PGS

Školitelka: RNDr. Jiřina Bártová, Csc., Výzkumný ústav stomatologický 1. LF UK a VFN

Úvod: Porovnáním cytokinových profilů hyper- a normocholesterolemického potkana po inokulaci suspektního patogena zubního povlaku *Porphyromonas gingivalis* chceme přispět k objasnění významu přítomnosti bakterií jako rizikového faktoru aterosklerózy.

Metodika: 3 samicím Pražského hereditárně hypercholesterolemického potkana a 3 normocholesterolemickým samicím potkana kmene Wistar stáří 9 měsíců jsme do ústní dutiny tamponem denně po dobu tří týdnů inokulovali stěr kolonie bakterie *Porphyromonas gingivalis*. Kontrolní zvířata (3 ke každé skupině) dostávala PBS.

Po skončení pokusu byla zvířata utracena a získány vzorky séra. Ke stanovení cytokinů v séru jsme použili komerční kit Rat Cytokine Array firmy Ray Biotech, Inc.

Výsledky: Zjistili jsme rozdíly v produkci cytokinů mezi jednotlivými skupinami pokusných zvířat. U Pražského hereditárně hypercholesterolemického potkana jsme po orální inokulaci *Porphyromonas gingivalis* našli kvantitativně menší produkci cytokinů oproti kontrolní skupině. U kmene Wistar byla produkce cytokinů po orální inokulaci *Porphyromonas gingivalis* větší než u kontrolní skupiny.

Závěr: Z těchto předběžných výsledků tedy usuzujeme, že orální inokulace *Porphyromonas gingivalis* u hypercholesterolemického potkana opačný vliv než u potkana normocholesterolemického.

STUDY OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF MOUSE RECOMBINANT PRION PROTEIN

Authors: Alexandr Pavlíček, 2. r. PGS, Karel Holada

Tutor: Ing. Karel Holada, PhD, Institute of Immunology and Microbiology, 1st Faculty of Medicine

Prions are class of the infectious agents that cause a group of fatal neurodegenerative diseases in which the cellular form of the prion protein (PrP^C) is transformed into the disease-related scrapie variant (PrP^{Sc}).

The two PrP isoforms differ in biophysical properties. The molecular mechanism by which the PrP^{Sc} is formed and causes infectivity or neurodegeneration is not fully understand.

Two years ago there were reported first cases of the transmission of the PrP^{Sc} by blood transfusion highlighting the need of understanding of PrP interaction with blood cells. For biochemical studies the sufficient amount of PrP is needed what underlines the importance of constructing of recombinant PrP.

We cloned gene of full length mouse prion protein (mPrP) into expression vector pHAT10 and purified it using immobilized metal ion affinity chromatography as his-tagged fusion protein. The insoluble purified mPrP was transformed into soluble form by dialysis using different conditions to refold mPrP in α -helical or β -sheet conformations corresponding with PrP^C and PrP^{Sc}. Refolding was analyzed by measuring of CD spectra and by treatment of mPrP by proteinase K.

GAČR310/04/0419, GAČR310/05/H533

ATM JAKO PREDISPOZIČNÍ FAKTOR U DĚDIČNÉHO KARCINOMU PRSU

Autorka: Jana Prokopcová, 2. r. PGS

Školitel: MUDr. Petr Pohlreich, Csc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK

Úvod: Ataxia telangiectasia (AT) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené inaktivací genu *ATM*. Projevuje se mozečkovou ataxií, defekty imunitního systému a predispozicí ke vzniku nádorů. U heterozygotů, kteří tvoří 0,35 % až 1 % běžné populace, bylo v postižených rodinách zjištěno vyšší riziko vzniku karcinomu prsu. Cílem práce bylo studium úlohy genu *ATM* v rodinách s dědičnou predispozicí ke karcinomu prsu a/nebo ovaria. Byly analyzovány mutace vedoucí ke zkrácení proteinu, které představují více než 70% inaktivujících genových alterací u pacientů s AT.



Metody: Kódující sekvence genu *ATM* byla analyzována u 179 pacientek z rizikových rodin u nichž nebyly nalezeny mutace genů *BRCA1/2*. K analýze byla použita RNA izolovaná z lymfocytů periferní krve, která byla zpětně přepsána do cDNA a amplifikována v sedmi překrývajících se fragmentech. Pre-screening mutací způsobujících zkrácení proteinu byl proveden pomocí PTT (Protein Truncation Test). K přesnému určení genového defektu bylo použito automatického sekvenování.

Výsledky: Byla nalezena jedna nonsense mutace a tři sestřihové mutace vedoucí k přeskoku exonu a posunu čtecího rámce. Nonsense mutace c.5932G>T vede k terminaci translace na kodonu 1978 a byla popsána u pacienta s AT. Mutace IVS36+1G>A porušující 5' místo sestřihu je nová. Další sestřihové varianty IVS43-9del5 a IVS10-6T>G zasahují polypyrimidinové úseky na 3' koncích intronů a také již byly popsány. Dvě ze zachycených mutací byly nalezeny u pacientek s bilaterálním karcinomem prsu, další dvě u případů časného karcinomu prsu.

Závěr: Četnost mutací v našem souboru pacientek byla 2,2 % (4/179), což svědčí pro význam genu *ATM* v tumorogenezi. Teprve analýza vyššího počtu rizikových rodin však umožní získat statisticky významná data.

Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR, č. NC 9051-3/2006 a Výzkumným záměrem MŠMT č. MSM0021620808.

ZHODNOCENÍ PERIOPERAČNÍ ZÁTĚŽE PŘI ZLOMENINÁCH PROXIMÁLNÍHO FEMORU MONITOROVÁNÍM TKÁŇOVÉ REAKCE

Autor: MUDr. Martin Sedlář, 2. r. PGS

Školitel: prof. MUDr. Miroslav Zeman, DrSc., I. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN, Ing. Jana Mrázková, Centrální hematologické laboratoře 1. LF UK a VFN, prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc., Centrální hematologické laboratoře 1. LF UK a VFN

Úvod: Při operačním řešení zlomenin proximálního femoru, které je dnes běžným způsobem ošetření, jsou v podstatě dvě možnosti v indikačním spektru, endoprotéza nebo osteosyntéza. Kloubní náhradu lze použít ve formě totální či cervikokapitální – hemiartroplastiku, syntéza je možná sklužným šroubem v kombinaci s nitrodřeňovým hřebem či extraoseální dlahou, jednotlivými šrouby a Enderovými pruty.

Protože převážnou většinu nemocných s touto diagnózou představují nemocní ve vyšších věkových kategoriích, je cílem práce objektivizovat perioperační zátěž monitorací hladin proteinů akutní fáze, cytokinů a adhesivních molekul. Na základě těchto zjištění pak vybrat nevhodnější léčebný postup únosný pro daného nemocného.

Materiál a metodika: Sledovanou skupinou bylo 59 pacientů s operačně léčenou zlomeninou proximálního femoru, operovaných na I. chirurgické klinice VFN a 1. LFUK v Praze v období 2004–2006. Monitorovány byly hladiny CRP, orosomukoidu, interleukinů 1 a 6 a adhesivních molekul a to v několika intervalech. Před operací, bezprostředně po operaci a 2. a 7. pooperační den – tedy do doby plné mobilizace nemocného.

Výsledky: V současné době je prováděna finalizace souboru pacientů a jeho statistického hodnocení. Předběžné výsledky získané na tomto souboru pacientů potvrzují menší perioperační zátěž u nemocných u kterých byla použita metoda „minimal invasive surgery“.

Závěr: Zhodnocení perioperační zátěže u nemocných se zlomeninou proximálního femoru monitorací tkáňové odpovědi spolu se zhodnocením typu zlomeniny a stavu pacienta napomáhá ke stanovení konečné indikace operační metody.

SYSTÉM PRO FUNKČNÍ ANALÝZU MUTACÍ V GENU BRCA1: HIT & FIX METODA

Autorka: Ing. Eva Scholzová, 3. r. PGS

Školitel: MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK

Mutace v genu *BRCA1* (Breast Cancer 1; OMIM 113705) jsou zodpovědné za více jak 50 % dědičných karcinomů prsu a/nebo ovária. Funkční charakteristika mutací odhalených během screeningu ohrožené populace žen je nutná k přesnému posouzení rizika vzniku nádoru u missense mutací nebo v případech kdy není proveditelná populačně-genetická studie. Metody funkční analýzy mutovaného genu zvýšením jeho exprese za použití konvenčních plazmidů neumožňují rekapitulaci fyziologických regulací *in vivo* a ve svém důsledku mohou vést k zavádějícím výsledkům. Konstrukce mutací v systému BAC (Bacterial Artificial Chromosome) zaručuje expresi zvoleného genu ve fyziologických hladinách a se zachováním *in vivo* regulací.

Na základě výsledků mutační analýzy populace žen ohrožených dědičným karcinomem prsu/ovária jsme vybrali nejčastější mutace v genu *BRCA1* (c.181T>G, c.1747A>T, c.3700_3704del5, c.5266dupC) pro funkční analýzu. Konstrukce mutací v BAC byla provedena pomocí rekombinačního systému bakteriofága λ . Využitím tzv. hit & fix metody bylo možné efektivně získat i BAC s tak jemnými změnami v genu *BRCA1*, které jsme pro funkční analýzu vybrali. V prvním kroku se zamění v BAC cca 20 nukleotidů wild-type (wt) *BRCA1* sekvence v okolí baze, kde se nachází daná mutace. K tomuto účelu se do bakterií vpraví denaturovaná lineární DNA, která je na obou koncích homologní k wt *BRCA1* sekvenci alespoň v délce 80 nukleotidů a aktivuje se rekombinací. Po selekci pozitivních klonů jsou v druhém kroku tyto nukleotidy stejným postupem přeměněny zpět na originální sekvenci a současně je vpravena žádaná mutace. Jelikož je v každém kroku metody změněno více nukleotidů (cca 20), screening pomocí specifické PCR nebo hybridizace je velmi efektivní.

BAC systém obsahující *BRCA1* gen s vnesenými mutacemi bude použit pro studium funkčních vlastností mutovaného *BRCA1* proteinu, což může umožnit zpřesnění odhadu rizika vzniku karcinomu prsu/ovária u nosiček studovaných mutací.

Projekt výzkumu byl podporován grantem IGA č. NR/8345-4.

MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MYH* U APC-NEGATIVNÍCH PACIENTŮ S KOLOREKTÁLNÍ POLYPÓZOU

Autor: Mgr. Martina Šulová, 2. r. PGS

Školitel: doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc., Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je autozomálně dominantně dědičná predispozice ke vzniku kolorektálního karcinomu charakterizovaná přítomností stovek až tisíců polypů v tlustém střevě a rektu. Příčinou vzniku FAP jsou zárodečné mutace v tumor-supresorovém genu *APC* (adenomatous polyposis coli). U 20–30 % pacientů s klinickými příznaky FAP a více než 90 % pacientů s atenuovanou formou polypózy (<100 kolorektálních adenomatózních polypů, AFAP) není identifikována zárodečná mutace v genu *APC*. V těchto případech se uvažuje o „mnohočetných adenomech“ neboli MYH-asociované polypóze (MAP). MAP je autozomálně recesivní onemocnění charakterizované přítomností 5-100 kolorektálních adenomatózních polypů. Příčinou onemocnění jsou zárodečné mutace v genu *MYH*. MYH protein hraje důležitou roli v systému báze excizní opravy (BER) jako adenin-specifická DNA glykosylasa.

Metodika: Genomová DNA byla izolována z leukocytů periferní krve a byla amplifikována metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Mutační analýza genu *MYH* byla provedena metodou denaturační vysokoučinné kapalinové chromatografie (dHPLC) s využitím systému WAVE (Transgenomic). Typ záměny a její přesná lokalizace byla určena následnou sekvenací na genetickém analyzátoru ABI Prism 310.

Výsledky: Molekulárně genetická analýza genu *MYH* odhalila v testovaném souboru 90 nepříbuzných pacientů s kolorektální polypózou (bez detekované zárodečné mutace v genu *APC*) 18 variací v sekvenci DNA. V deseti případech se jednalo o intronické záměny, z nichž pět bylo již dříve popsáno. U zbylých osmi variací se jednalo o záměny v exonech. Dvě z těchto exonických alterací představují nejčastěji se vyskytující mutace Y165C a G362D, které jsou příčinou kolorektální polypózy. Další čtyři nalezené exonické záměny představují již dříve popsané polymorfismy. Zbylé dvě variace jsou nově nalezené záměny.

Závěr: U dvou nepříbuzných probandů byly detekovány bialelické zárodečné mutace v genu *MYH*, což potvrzuje nedávný poznatek, že mohou mutace v genu *MYH* způsobit fenotyp mnohočetných adenomů s autozomálně recesivním typem dědičnosti. Je prozatím předčasné posuzovat význam dalších nalezených změn v genu *MYH*. Tyto sekvenční změny totiž vyžadují podrobnější analýzu včetně korelace s klinickými projevy.

TKÁŇOVÁ A KLINICKÁ REAKCE PŘI PENTASACHARIDOVÉ PREVENCI, FÁZE II

Autor: MUDr. Stanislav Trča, 5. r. PGS, I. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN

Školitelé: prim. doc. MUDr. Zdeněk Krška, CSc., I. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN, MUDr. Zuzana Kudrnová, Centrální hematologické laboratoře 1. LF UK a VFN, Ing. Jana Mrázková, Centrální hematologické laboratoře 1. LF UK a VFN, prof. MUDr. Jan. Kvasnička, DrSc., Centrální hematologické laboratoře 1. LF UK a VFN

Úvod: Toto sdělení navazuje na úvodní příspěvek přednesený na 5. SVK. Zpracovává rozšířený soubor pacientů. Dále na tuto práci navazuje další sledování ovlivnění stavu pacienta a odpovědi organismu v závislosti na provedeném operačním chirurgickém zákroku, které probíhá též na našem pracovišti.

Pacienti a metodika: Sledovanou skupinou byli pacienti s operačně léčenou zlomeninou proximální třetiny stehenní kosti operovaní na I. chirurgické klinice VFN a 1. LF UK v Praze v období 2001–2005. K počáteční referované skupině 46 pacientů bylo v následujícím období doplněno 59 pacientů.

Výsledky: V současné době je prováděna finalizace souboru pacientů a jeho statistického zhodnocení. Předběžné výsledky získané na tomto rozšířeném souboru pacientů potvrzují výsledky první fáze sledování. Tedy vyrovnanější hemostazeologický stav ve skupinách s farmakologickou prevencí TEN prováděnou LMWH a dlouhodobě podávaného pentasacharidu. Byl pozorován nižší výskyt asymptomatické proximální i distální hluboké žilné trombózy DK ve skupině pacientů s dlouhodobým podáváním pentasacharidu.

Závěr: Výsledky rozšířeného souboru ve shodě se souborem pilotním potvrzují vyslovený předpoklad, že dlouhodobá farmakologická prevence TEN zajištěná preparáty LMWH a zvláště pentasacharidy při jejich dlouhodobém podání se jeví jako vhodná metoda vzhledem k její účinnosti, bezpečnosti, statisticky významně lepším výsledkům.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ TEORETICKÁ ČÁST
VÍTĚZNÉ PRÁCE



VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO SEKCE PREGRADUÁLNÍ – ČÁST TEORETICKÁ

1. místo: **Minks Jakub, 5. r.**

Školitel: MUDr. Ivan Šebesta, CSc., MUDr. Martin Hřebíček

Název práce: „Vyšetření inaktivace chromosomu X pomocí methylačně specifické PCR“

2. místo: **Říha Pavel, 5. r.**

Školitel: Priv. – Doz. Dr. med. Albert Smolenski, Dipl. Biol. Meike Hoffmeister, Ph.D.

Název práce: „Regulation of Rap 1 GAP2/14-3-3 binding is a novel mechanism of prostacyclin and nitric oxide inhibitory function in human platelets“

3. místo: **Ullmanová Iva, 3. r.**

Školitel: odb. as. MUDr. Šeda, Ph.D.

Název práce: „Charakteristika dynamiky genetické analýzy metabolického syndromu na základě diferenciální vazebné analýzy“



1. MÍSTO

VYŠETŘENÍ INAKTIVACE CHROMOSOMU X POMOCÍ METHYLAČNĚ SPECIFICKÉ PCR

Autor: Jakub Minks^{1,2}, Lenka Dvořáková¹, Robert Dobrovolný¹, Martin Hřebíček¹

Školitel: MUDr. Ivan Šebesta^{1,2}, CSc.



Jakub Minks

¹ Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF UK, Praha

² VŠCHT Praha

ÚVOD

Ženy mají v porovnání s muži dvojnásobný počet X chromosomů. Kompenzace dávky genů kódovaných na gonozomech je u žen zajištěna náhodnou inaktivací jednoho ze dvou chromosomů v buňce: maternálního (Xm) či paternálního (Xp). Lze očekávat, že poměr aktivního Xm : Xp v populaci bude odpovídat Gaussovu rozdělení. Existují proto jedinci, u nichž je preferenčně inaktivován jeden z chromosomů. Tento posun může být dílem náhody, nebo může být zapříčiněn mutací v genech na X chromosomu, které se účastní řízení inaktivace či které mají vliv na růst buňky. U řady gonozomálně dědičných chorob je tíže projevů onemocnění u heterozygotek závislá na míře inaktivace zdravé alely; vzácně u nich může onemocnění probíhat stejně těžce jako u hemizygotních mužů.

Inaktivace je řízena geny kódovanými v XIC lokusu (X inaktivační centrum), v blízkosti centromery chromosomu X. Dochází k ní v časném embryonálním stádiu za vzniku heterochromatinu, který lze pozorovat jako tzv. Barrovo tělísko. Pro heterochromatin neaktivního chromosomu X jsou typické mj. modifikované histony a methylované cytosiny v CpG dinukleotidech DNA.

Cílem naší práce bylo zavést vhodnou metodu pro hodnocení posunu inaktivace. Pro ověření metody jsme provedli studii na kontrolním vzorku 100 žen. U tohoto souboru jsme vyhodnotili četnost a míru posunu, ověřili korelaci míry posunu s věkem a zároveň vyhledali ženy s výrazným (? 80:20) posunem inaktivace. Takto validovanou metodu využíváme pro vyšetření posunu u pacientů heterozygotních pro gonozomálně recesivní dědičné metabolické poruchy a jejich příbuzných.

METODIKA

Metoda využitá pro hodnocení posunu X inaktivace se opírá o tři pilíře: odlišení paternálního a maternálního chromosomu X, odlišení aktivního a neaktivního chromosomu X a kvantitativní analýzu.

Pro vyšetření je využito délkového polymorfismu v promotoru genu pro lidský androgenní receptor. U přibližně 80 % žen je jiný počet opakování CAG trinukleotidů na paternálním a maternálním X chromosomu. Vyšetřením rodičů lze určit, který počet opakování odpovídá chromosomu nesoucímu mutovanou alelu.

DNA na inaktivním X chromosomu (Xi) je na rozdíl od aktivního (Xa) methylovaná. Působením disířičitanu se nemethylované cytosiny deaminují na uracily, které se při PCR amplifikují jako thymin. Methylované cytosiny s disířičitanem nereagují. Po modifikaci se gDNA izolovaná z leukocytů amplifikuje methylačně specifickou PCR s primery pro Xi a Xa. Ve dvou PCR reakcích (pro Xi a Xa) tedy získáme vždy směs produktů o dvou různých délkách, kdy jeden odpovídá Xp a druhý Xm. Vzniklé produkty jsou genotypovány na DNA sekvenátoru ABI Alf Express resp. ABI 3100 Avant. Z porovnání ploch peaků odpovídajících maternálnímu a paternálnímu X chromosomu na Xi a Xa se určí posun inaktivace.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ze 100 náhodně vybraných žen bylo 67 vzorků (9 až 72 let, průměr 35,5 let) informativních pro délkový polymorfismus. Každý z těchto vzorků byl hodnocen v dubletu. Pouze u 3 vzorků se výsledek lišil o více než 10 %. Medián i průměr rozdílu mezi hodnoceními byl menší než 4 %.

Správnost jsme ověřili stanovením hodnoty posunu u série 10 uměle vytvořených vzorků vzniklých směsí dvou neinformativních gDNA o známém molárním poměru. Pokus byl opakován dvakrát, lineární regrese poskytla tyto parametry: $y = 0,941x$, $R^2 = 0.996$, resp. $y = 0,921x$, $R^2 = 0.996$.

Výrazný (? 80:20) posun inaktivace jsme pozorovali u 7,5 % žen, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky.

V našem souboru jsme nepotvrdili korelaci míry posunu s věkem (korelační koeficient lineární regrese $R^2 = 0,003$). Existuje řada publikací, které svědčí pro to, že posun inaktivace s věkem roste. Jiní autoři však toto nepotvrdili. Články se ovšem liší v použité metodice, jakož i velikostí a věkovým složením zkoumaného souboru žen. Celá otázka, jakkoliv zajímavá a užitečná pro stanovení posunu z periferní krve, je poněkud umělá, neboť u většiny nemocí jsou pro patogeni podstatné jiné tkáně.

Vyšetřili jsme dále 16 heterozygotek pro gonozomálně dědičné choroby a jejich příbuzných. Výrazný posun jsme pozorovali u 7 žen z 5 různých rodin. Využití popsaného přístupu dokumentuje případ rodiny s heterozygotně nesenou mutací genu pro hypoxanthin-fosforybosltransferasu (HPRT, EC 2.4.2.8), jež se klinicky projevuje jako Lesch-Nyhanův syndrom s hyperurikémií a dnovou artritidou. Obě sestry nesou stejný genotyp, ale rozdílný fenotyp, kdy pouze jedna z nich měla deficit HPRT. V této rodině jsme u třech generací žen zjistili výrazný posun inaktivace. Vyšetření dále odhalilo, že postižená sestra má preferenčně (88:12) inaktivován maternální X chromosom nesoucí zdravou alelu genu pro HPRT. Sestra bez klinických příznaků přepisuje oproti tomu kopii genu preferenčně (15:85) z paternální, tedy nemutované alely. Tyto výsledky svědčí pro podstatný vliv inaktivace na projevy choroby.

ZÁVĚR

Ověřili jsme správnost metody a dosáhli vyšší přesnosti, než při použití methylačně senzitivních restričních endonukleas. Aplikaci bisulfitové metody chceme přispět k objasnění manifestace gonozomálně dědičných nemocí u heterozygotek, vyhledat rodiny s dědičným posunem X inaktivace a pokusit se najít příčiny tohoto jevu.

Práce byla financována z grantu IGA MZNR8361-3/2005



Předávání cen v Akademickém klubu 1. LF UK – zleva proděkan prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc., proděkan prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc., a děkan 1. LF UK prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.



2. MÍSTO

REGULATION OF RAP1GAP2/14-3-3 BINDING IS A NOVEL MECHANISM OF PROSTACYCLIN AND NITRIC OXIDE INHIBITORY FUNCTION IN HUMAN PLATELETS



Pavel Říha

Author: Pavel Říha ^{1,2}

Tutors: Priv.-Doz. Dr. med. Albert Smolenski ²

Dipl. Biol. Meike Hoffmeister, Ph.D. ²

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

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

Key Words: 14-3-3 / ADP / cAK / cGK / NO / PGI₂ / platelets / Rap1 / Rap1GAP2 / thrombin

Correspondence to Pavel Říha: p.riha@seznam.cz

INTRODUCTION

Thrombocytes are discoid anucleate cell fragments involved in cellular mechanisms of blood clot formation, repair of endothelium and regulation of inflammation (Mannel and Grau 1997). Blood platelets are of central importance in the development of arterial thrombosis and cardiovascular diseases. No other single cell type is responsible for as much morbidity and mortality as platelets (Bhatt and Topol 2003; Jackson and Schoenwaelder 2003).

Platelet activators like ADP or thrombin cause rapid intense activation of Rap1B (Abrams 2005). Rap1B is a Ras-like small guanine nucleotide binding protein (Bos, de Rooij et al. 2001). Its function is the control of integrin $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ (GPIIb-IIIa) activity and thus control of platelet adhesion, aggregation and thrombus formation (Bos, de Bruyn et al. 2003; de Bruyn, Zwartkruis et al. 2003; Chrzanowska-Wodnicka, Smyth et al. 2005). Rap1B cycles between an active GTP-bound conformation and an inactive GDP-bound conformation. Since Rap1B has a low intrinsic activity, guanine nucleotide exchange factors (GEFs) are needed to switch Rap1B to the active GTP-bound conformation that triggers platelet aggregation (Crittenden, Bergmeier et al. 2004). GTPase activating proteins (GAPs) terminate Rap1B-GTP signals and keep Rap1B in its inactive GDP-bound conformation.

Recently discovered Rap1GAP2 was characterized as the only GAP of Rap1B in platelets (Schultess, Danielewski et al. 2005). Rap1GAP2, a relative of Rap1GAP1 protein (Daumke, Weyand et al. 2004), is the common target of two major inhibitory pathways in platelets. Endothelium-derived nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) activate platelet guanylyl- and adenylyl cyclases. Synthesized cGMP and cAMP activate cGMP- and cAMP-dependent protein kinases (cGK and cAK, respectively) that phosphorylate Rap1GAP2 on serine 7 residue (Schultess, Danielewski et al. 2005).

NO and PGI₂ signalling lead to inhibition of platelet activation, adhesion and aggregation (Beavo and Brunton 2002; Feil, Lohmann et al. 2003), however no direct connections between phosphorylation of a substrate and platelet inhibition have been revealed yet. Since Rap1GAP2 inhibits Rap1-GTP activity and thereby inhibits integrin function and thus platelet aggregation, adhesion and thrombus formation, the phosphorylation of Rap1GAP2 may play a central role in platelet inhibition by NO and PGI₂.

14-3-3 proteins bind discrete phosphoserine or phosphothreonine motifs specifically. 14-3-3 proteins constitute a ubiquitously expressed evolutionary conserved exclusively eukaryotic protein family. 14-3-3s modulate diverse cellular processes. The effects of 14-3-3 proteins on their targets are (I) conformational changes, (II) physical occlusion of sequence-specific or structural protein features or (III) scaffolding. Thus 14-3-3 proteins modulate enzymatic activity, regulate protein localization and inhibit or mediate protein interactions (Bridges and Moorhead 2005). 14-3-3 proteins form homo- and heterodimers. 14-3-3 isoforms β , γ and ζ are highly expressed in platelets (Wheeler-Jones, Learmonth et al. 1996). More than 200 interaction partners of 14-3-3 proteins have been identified in human cells (Pozuelo Rubio, Geraghty et al. 2004), however so far only one in human platelets: GPIb, a part of the platelet von Willebrand factor receptor (Mangin, David et al. 2004; Dai, Bodnar et al. 2005).

In order to better understand the regulation of platelet adhesion, aggregation and thrombus formation we studied Rap1GAP2 function. We identified 14-3-3 proteins as Rap1GAP2 binding partners, mapped the 14-3-3 binding site within Rap1GAP2 and assessed the regulation of Rap1GAP2/14-3-3 interaction in human platelets.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Human thrombin, ADP, sodium-nitroprusside (SNP) and forskolin were obtained from Sigma (Taufkirchen, Germany). Prostacyclin (PGI₂) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, USA). Vardenafil was donated by Bayer Pharma (Leverkusen, Germany).

Rap1GAP2 and serine 7 phosphorylated Rap1GAP2 was detected by corresponding polyclonal antibodies (Schultess, Danielewski et al. 2005). Commercially available antibodies were used for FLAG-tag detection (Sigma, Taufkirchen, Germany). Secondary antibodies HRP-coupled goat-anti-rabbit and goat-anti-mouse were from Dianova (Hamburg, Germany).

Site-directed mutagenesis of Rap1GAP2 was performed by polymerase chain reaction amplification of Rap1GAP2-FLAG-pcDNA4/TO using mutagenic primer pairs, Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, USA), digestion with DpnI (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) and transformation in XL-10 Gold bacteria.

14-3-3 β and 14-3-3 ζ cDNAs were cloned into pGEX-4T3 vector (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) containing glutathion-S-transferase (GST) cDNA. GST-14-3-3 chimeric proteins were expressed in *E. coli* BL21 and purified on GSH-sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany).

Cell culture and transfection

COS-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) at 37 °C and ambient air supplemented with 5% CO₂. Transient transfections of COS-1 cells were performed with DEAE-dextran. 6×10⁵ cells were seeded per 10 cm dish. On the following day cells were washed with PBS and expression plasmids were applied in 5.7 ml serum-free medium mixed with 300 μ l of DEAE-dextran (1 mg/ml stock) and 12 μ l chloroquine (100 mM stock). After incubation for 2 hours, the transfection mixture was removed and the cells were cultured in DMEM with 10% FCS and 1% P/S for 24 – 48 hours prior to use.

Platelet preparation

Venous blood was drawn from healthy volunteers taking no medications, who gave their informed consent according to the declaration of Helsinki. Washed platelets were obtained by sequential centrifugation as previously described (Danielewski, Schultess et al. 2005).

Lysate preparation

Adherent COS-1 cells were detached by scraping with a rubber policeman and washed 3 times with PBS. The lysates were prepared resuspending washed platelets or washed cells in ice-cold lysis-buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1% Triton; 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ with phosphatase inhibitors (1 mM Na₃VO₄; 50 mM NaF; 5 mM Na₄P₂O₇) and protease inhibitors (2 μ g/ μ l aprotinin; 1 μ g/ μ l leupeptin; 0.1 mM PMSF)). After 20 minutes, the lysates were centrifuged at 14000g for 20 minutes to remove insoluble material.

Pull-Down experiments

5 μ l of GSH-sepharose bead suspension saturated with GST-14-3-3b or GST-14-3-3z were added to 500 μ l of platelet or cell lysate and rotated at 4 °C overnight. The beads were washed 5 times with the lysis-buffer before adding 20 μ l 3× Laemmli-buffer and boiling for 5 minutes. Proteins were separated by SDS-PAGE and identified by immunoblotting as described before (Schultess, Danielewski et al. 2005). Rap1-GTP pull-down assays were performed as described (Danielewski, Schultess et al. 2005) using GSH-sepharose bead suspension saturated with GST-RalGDS-RBD to precipitate Rap1-GTP from cell lysates. All shown experiments were performed at least 3 times and produced similar results.

RESULTS

14-3-3 interaction with endogenous Rap1GAP2

14-3-3 β and 14-3-3 ζ proteins were identified as interaction partners of Rap1GAP2 in human platelets. The endogenous Rap1GAP2 bound to 14-3-3 β and 14-3-3 ζ isoforms with the similar affinity, while control GST-GFP fusion protein did not bind Rap1GAP2 (Fig. 1).

Mapping of Rap1GAP2/14-3-3 binding site

The 14-3-3 binding site was mapped to N-terminal region of Rap1GAP2. The N-terminus of Rap1GAP2 resembles the previously described mode I consensus for 14-3-3 binding (Yaffe, Rittinger et al. 1997; Bridges and Moorhead 2005) with the difference only in the final two amino acid residues. Serine 9 of Rap1GAP2 was predicted as the phosphorylated serine residue required for 14-3-3 binding. This hypothesis was tested by mutational analysis of serine 7 and serine 9 residues of Rap1GAP2 followed by pull-down experiments with GST-14-3-3 β and GST-14-3-3 ζ chimeric proteins. Mutation of serine 9 to alanine (S9A) or to glutamic acid (S9E) abolished 14-3-3 binding completely (Fig. 2). The 14-3-3 binding motif includes serine 7, the previously identified phosphorylation site for cGK and cAK. To determine the role of serine 7 in Rap1GAP2/14-3-3 interaction it was mutated either to alanine (S7A) or to glutamic acid (S7E). Rap1GAP2

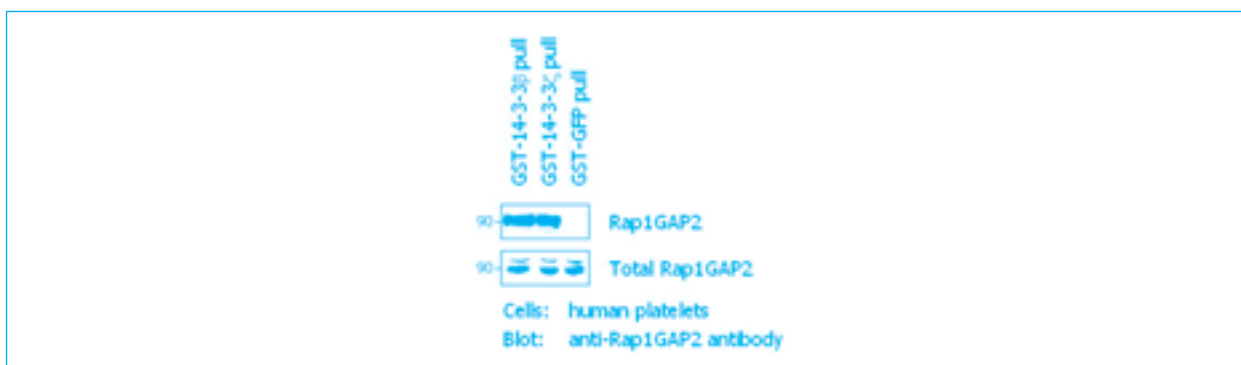


FIGURE 1: BINDING OF ENDOGENOUS RAP1GAP2 TO 14-3-3 PROTEINS

Lysate of freshly isolated washed human platelets was incubated with equal amounts of GSH-sepharose coupled chimeric proteins GST-14-3-3b, GST-14-3-3z and GST-GFP as control. Bound proteins were eluted from beads and detected with an antibody specific for Rap1GAP2. The lower panel shows a Rap1GAP2 expression control.

S7A was pulled-down similarly to wild-type Rap1GAP2. Rap1GAP2 S7E mutant, as well as double mutants of serine 7 and serine 9 residues did not bind 14-3-3 at all (Fig. 2).

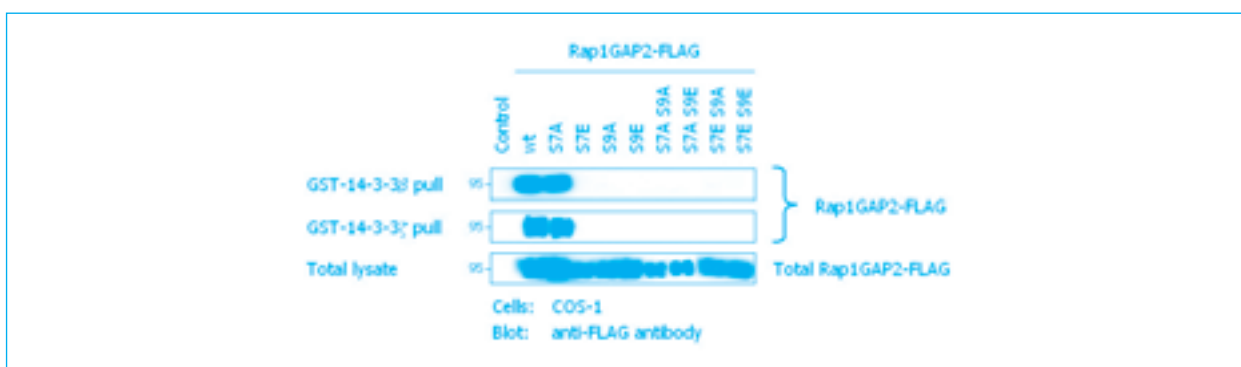


FIGURE 2: MAPPING OF RAP1GAP2/14-3-3 BINDING SITE

COS-1 were transfected without or with wild-type FLAG-tagged Rap1GAP2 or various point mutants of serine 7 or serine 9 changed to alanine or glutamic acid. Equal amounts of GST-14-3-3b (upper panel) and GST-14-3-3z (middle panel) coupled to GSH-sepharose beads were used for precipitation. Bound proteins were eluted from the beads and visualized by immunoblot analysis with a FLAG-specific antibody. The lower panel shows the expression levels of Rap1GAP2 proteins.

These results denote the serine 9 of Rap1GAP2 as binding site for 14-3-3 proteins. Serine 7 represents the regulatory site for Rap1GAP2/14-3-3 interaction.

Regulation of Rap1GAP2/14-3-3 interaction by platelet inhibition pathways

In order to assess the regulation and the physiological role of Rap1GAP2/14-3-3 interaction, intact human platelets studied *ex vivo* were treated by cAMP- and cGMP-elevating agents and the Rap1GAP2/14-3-3 interaction was analysed in pull-down experiments.

The cAMP production in platelets was stimulated by treatment with the receptor agonist PGI₂ or forskolin, a direct adenylyl cyclase activator. After treatment, platelets were lysed and GST-14-3-3 was used to precipitate endogenous Rap1GAP2. Precipitated Rap1GAP2, total Rap1GAP2 and serine 7 phosphorylated Rap1GAP2 were measured by immunoblot. Both treatments inhibited Rap1GAP2/14-3-3 interaction. The reduced binding correlated with increased Rap1GAP2 serine 7 phosphorylation (Fig. 3 and Fig. 4).

The cGMP production was stimulated by NO-donor SNP. After the treatment, platelets were handled as previously described. SNP treatment reduced Rap1GAP2/14-3-3 interaction (Fig. 5). This effect was intensified by preincubation of platelets with vardenafil (Fig. 5), a potent inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5) that hydrolyses cGMP efficiently (Feil, Lohmann et al. 2003). The reduced binding correlated with increased Rap1GAP2 serine 7 phosphorylation as before.

Regulation of Rap1GAP2/14-3-3 interaction by platelet activation pathways

Since Rap1GAP2/14-3-3 interaction was blocked by cAMP and cGMP regulated platelet inhibition pathways, the opposite effect of platelet activation pathways was hypothesized. The treatment by ADP and thrombin increase Rap1GAP2/14-3-3 binding in platelets. This increased Rap1GAP2/14-3-3 binding correlated with increased levels of Rap1B-GTP isoform (Fig. 6).

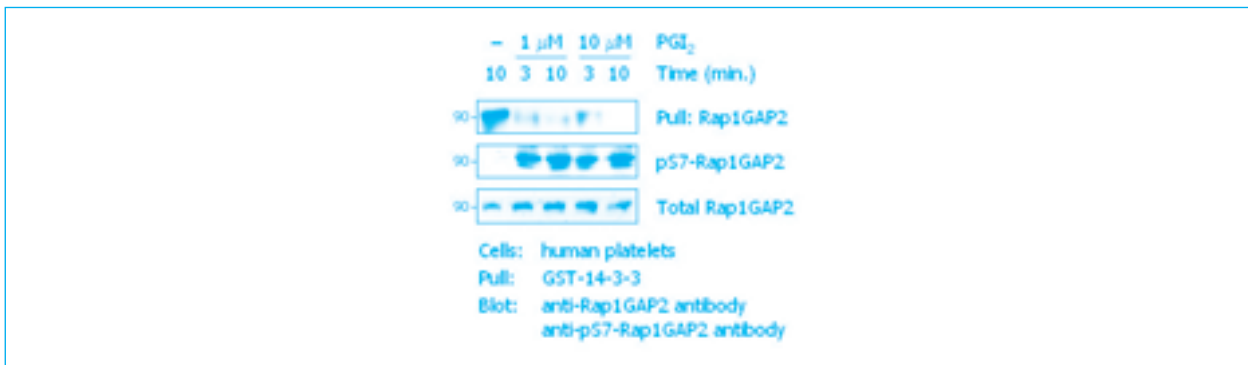


FIGURE 3: REGULATION OF RAP1GAP2/14-3-3 INTERACTION BY PGI₂

Freshly prepared washed human platelets were treated with PGI₂ as indicated. After lysis, equal amounts of GST-14-3-3 coupled to GSH-sepharose beads were used for precipitation. Bound proteins were eluted from the beads and visualized by immunoblot analysis with anti-Rap1GAP2 (upper panel) and anti-serine 7 phosphorylated Rap1GAP2 antibodies (middle panel). The lower panel shows the expression levels of Rap1GAP2 proteins.

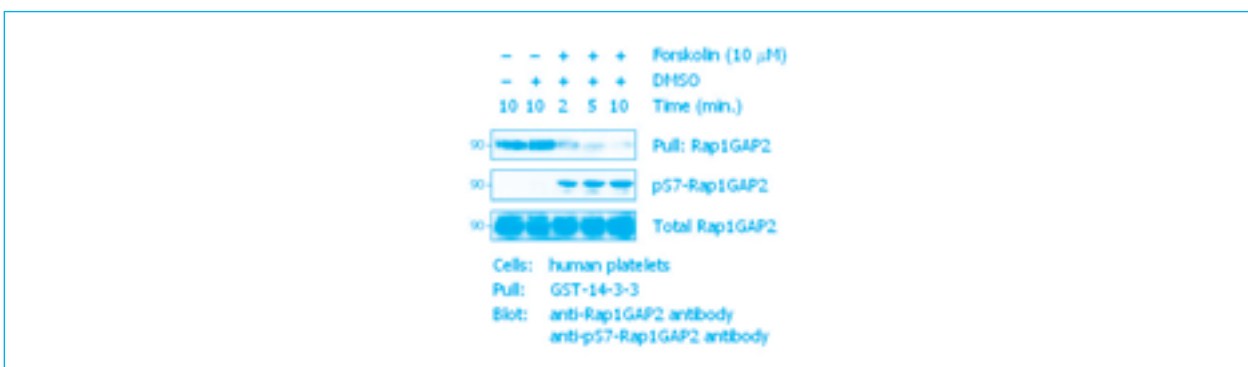


FIGURE 4: REGULATION OF RAP1GAP2/14-3-3 INTERACTION BY FORSKOLIN

Washed human platelets were treated with forskolin as indicated. Then platelets were lysed and analysed as described in Fig. 3.

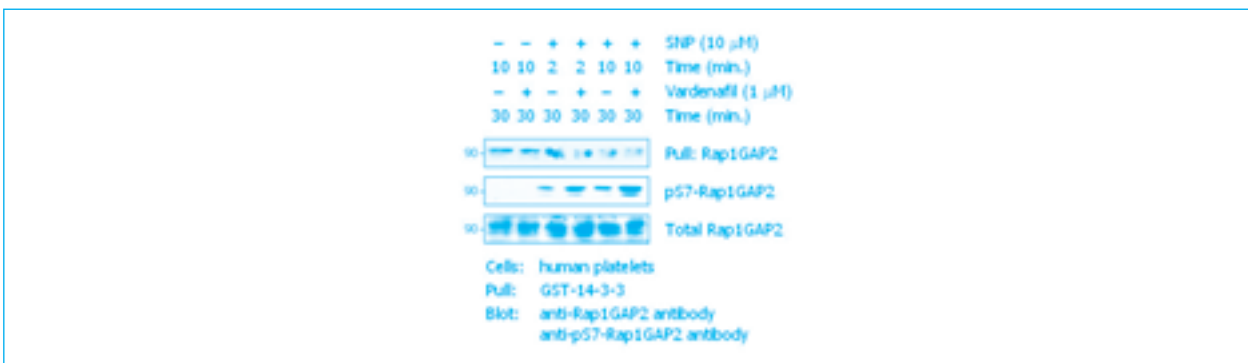


FIGURE 5: REGULATION OF RAP1GAP2/14-3-3 INTERACTION BY NO

Washed human platelets were treated without or with vardenafil followed by SNP as indicated. Then platelets were lysed and analysed as described in Fig. 3.

DISCUSSION

Rap1GAP2/14-3-3 Interaction

Serine 9 of Rap1GAP2 is the phosphorylated residue for 14-3-3 protein binding. The identity of the Rap1GAP2 serine 9 kinase remains to be determined. Since the Rap1GAP2/14-3-3 interaction was increased in ADP and thrombin treated platelets, the possible kinase could be protein kinase B (PKB). PKB is an established element of pathways downstream of ADP and thrombin.

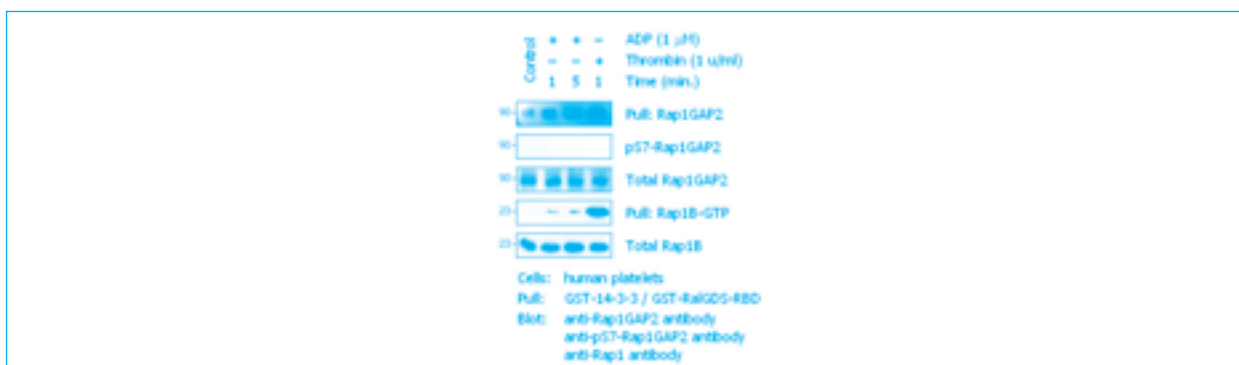


FIGURE 6: REGULATION OF RAP1GAP2/14-3-3 INTERACTION BY ADP AND THROMBIN

Freshly isolated human platelets were treated without or with 10 μM ADP for the indicated times or with 1 U/ml thrombin for 1 minute. Then platelets were lysed and pull-down assays using GST-14-3-3 were performed as described in Fig. 3. In parallel Rap1-GTP levels were determined by pull-down and immunoblot as described in Materials and Methods. Total cell lysates were analysed by immunoblot to measure total amounts of Rap1GAP2, serine 7 phosphorylated Rap1GAP2 and Rap1.

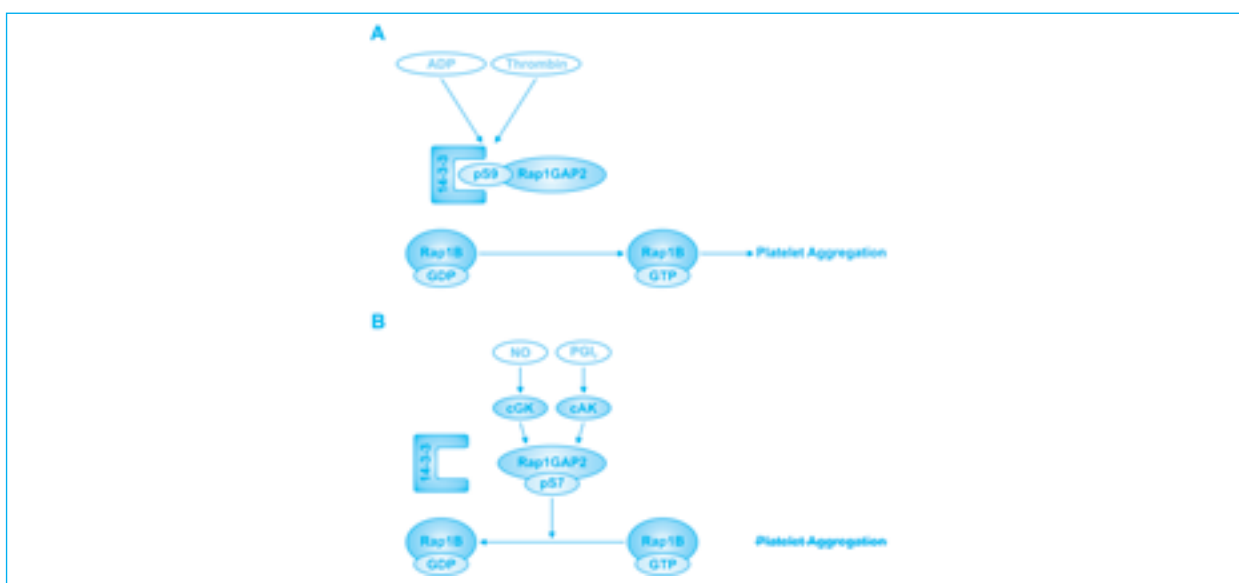


FIGURE 7: A NOVEL INTERSECTION OF PLATELET ACTIVATION AND INHIBITION PATHWAYS

A) Rap1GAP2 is kept inactive by ADP and thrombin triggered 14-3-3 binding. Rap1-GDP can be converted to the Rap1-GTP and activate platelet adhesion, aggregation and thrombus formation.

B) Stimulation of NO/cGMP and PGI₂/cAMP signalling pathways induces phosphorylation of Rap1GAP2 on serine 7 residue followed by detachment of 14-3-3 proteins. Rap1GAP2 is activated and inhibits Rap1-GTP formation.

Serine 7 of Rap1GAP2 represents a regulatory site modulating 14-3-3 binding. The regulatory function of serine at – 2 position in type I consensus motif for 14-3-3 binding was described rarely, for example in the tumour suppressor protein p53 (Waterman, Stavridi et al. 1998) and in the protein phosphatase Cdc25C (Bulavin, Higashimoto et al. 2003).

Regulation of Rap1GAP2 activity

Endothelium-derived PGI₂ and NO trigger cAK- and cGK-mediated phosphorylation of Rap1GAP2 on serine 7 that abolishes Rap1GAP2/14-3-3 interaction. The decreased Rap1GAP2/14-3-3 binding correlates with reduced Rap1-GTP levels (Fig. 6). Since Rap1GAP2 is the only GAP of Rap1B in human platelets, described mechanism could explain effects of both PGI₂ and NO on the inhibition of platelet adhesion, aggregation and thrombus formation.

As platelet activation pathways increase the Rap1GAP2/14-3-3 binding, the regulation of Rap1GAP2/14-3-3 interaction represents a novel intersection of platelet inhibition and activation pathways (Fig. 6).

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is deeply indebted to his tutors Albert Smolenski and Meike Hoffmeister for their kind support and valuable advices, members of Platelet Signalling Group Oliver Danielewski, Simone Kobe de Oliveira and Olga Neumüller and last

but not least Prof. Werner Müller-Esterl. A special acknowledgement belongs to all blood donors and Bayer Pharma for providing vardenafil.

This study was supported by a grant Deutsche Forschungsgemeinschaft given to A.S. and Program na podporu rozvoje internacionalizace MŠMT ČR fellowship given to P.Ř.

REFERENCES

1. Abrams, C. S. (2005). „Intracellular signaling in platelets." *Curr Opin Hematol* 12(5): 401-5.
2. Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002). „Cyclic nucleotide research — still expanding after half a century." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 710-8.
3. Bhatt, D. L. and E. J. Topol (2003). „Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy." *Nat Rev Drug Discov* 2(1): 15-28.
4. Bos, J. L., K. de Bruyn, et al. (2003). „The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 83-6.
5. Bos, J. L., J. de Rooij, et al. (2001). „Rap1 signalling: adhering to new models." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(5): 369-77.
6. Bridges, D. and G. B. Moorhead (2005). „14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein." *Sci STKE* 2005(296): re10.
7. Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, et al. (2003). „Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry." *Nat Cell Biol* 5(6): 545-51.
8. Crittenden, J. R., W. Bergmeier, et al. (2004). „CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation." *Nat Med* 10(9): 982-6.
9. Dai, K., R. Bodnar, et al. (2005). „A critical role for 14-3-3zeta protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications." *Blood* 106(6): 1975-81.
10. Danielewski, O., J. Schultess, et al. (2005). „The NO/cGMP pathway inhibits Rap 1 activation in human platelets via cGMP-dependent protein kinase I." *Thromb Haemost* 93(2): 319-25.
11. Daumke, O., M. Weyand, et al. (2004). „The GTPase-activating protein Rap1GAP uses a catalytic asparagine." *Nature* 429(6988): 197-201.
12. de Bruyn, K. M., F. J. Zwartkruis, et al. (2003). „The small GTPase Rap1 is activated by turbulence and is involved in integrin [alpha]IIb[beta]3-mediated cell adhesion in human megakaryocytes." *J Biol Chem* 278(25): 22412-7.
13. Feil, R., S. M. Lohmann, et al. (2003). „Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice." *Circ Res* 93(10): 907-16.
14. Chrzanowska-Wodnicka, M., S. S. Smyth, et al. (2005). „Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice." *J Clin Invest* 115(3): 680-7.
15. Jackson, S. P. and S. M. Schoenwaelder (2003). „Antiplatelet therapy: in search of the ‚magic bullet‘." *Nat Rev Drug Discov* 2(10): 775-89.
16. Mangin, P., T. David, et al. (2004). „Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Iba1." *Blood* 104(2): 420-7.
17. Mannel, D. N. and G. E. Grau (1997). „Role of platelet adhesion in homeostasis and immunopathology." *Mol Pathol* 50(4): 175-85.
18. Pozuelo Rubio, M., K. M. Geraghty, et al. (2004). „14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking." *Biochem J* 379(Pt 2): 395-408.
19. Schultess, J., O. Danielewski, et al. (2005). „Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets." *Blood* 105(8): 3185-92.
20. Waterman, M. J., E. S. Stavridi, et al. (1998). „ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins." *Nat Genet* 19(2): 175-8.
21. Wheeler-Jones, C. P., M. P. Learmonth, et al. (1996). „Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation." *Biochem J* 315 (Pt 1): 41-7.
22. Yaffe, M. B., K. Rittinger, et al. (1997). „The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity." *Cell* 91(7): 961-71.



3. MÍSTO

CHARAKTERISTIKA DYNAMIKY GENETICKÉ ARCHITEKTURY METABOLICKÉHO SYNDROMU NA ZÁKLADĚ DIFERENCIÁLNÍ VAZEBNÉ ANALÝZY

Autoři: Iva Ullmanová, Ondřej Šeda, František Liška, Ludmila Kazdová, Lucie Šedová, Drahomíra Křenová, Květa Pelinková, Tomáš Zima, Junzheng Peng, Johanne Tremblay, Pavel Hamet, Vladimír Křen

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



Iva Ullmanová

ÚVOD

Metabolický syndrom je klasickým příkladem komplexního genetického onemocnění. U těchto onemocnění se uplatňuje genetická komponenta, která je výslednicí působení více genů, interagujících mezi sebou, a zároveň ovlivnění faktory vnějšího prostředí, např. dieta a medikace. Jde tedy o soubor komplexních znaků, který vykazuje oligogenní dědičnost. Detailní genetická analýza metabolického syndromu v lidské populaci je komplikována především dvěma faktory: genetickou heterogenitou a nepřesným vymezením fenotypu. Proto jsou s výhodou využívány geneticky definované modely, které umožňují detailní zkoumání intermediárních fenotypů komplexních onemocnění, jakým je právě metabolický syndrom.

METODY

Experimentální kmeny. Polydaktylní kmen potkana PD/Cub (Cub = Charles University, Institute of Biology), Rat Genome Database (<http://rgd.mcg.edu>, ID 728161, byl vytvořen z geneticky nehomogenního kmene Wistar, kde byla zachycena malformace končetin, zahrnující polydaktylii preaxiální (palcové) strany a postižení kostí berce, projevující se „luxací“ zadních končetin (syndrom polydaktylie-luxace). Kmen PD/Cub je od roku 1969 chován na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1.LF UK systémem cíleného křížení bratr x sestra po více než 90 generací (Křen 1975). U tohoto kmene byla též zjištěna hypertriglyceridémie (Vrána et al. 1993) a posléze byl ustaven jako model metabolického syndromu (Šedová et al. 2000; Šeda et al 2005) a farmakogenomických a nutrigenomických aspektů těchto onemocnění (Šeda et al 2003; Šedová et al 2004).

Kmen Brown Norway (BN), Rat Genome Database ID 737899, pochází z divoce žijících potkanů odchycených v roce 1917 v USA a následně chovaných odděleně od ostatních kmenů. Od roku 1964 je tento kmen chován na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK systémem cíleného křížení bratr x sestra po více než 90 generací. Kmen BN/Cub je často využíván jako kontrolní kmen u metabolických a fyziologických studií. Genom tohoto kmene byl plně sekvenován a v současnosti je systematicky analyzován i jeho fenom (Kwitek et al., 2006).

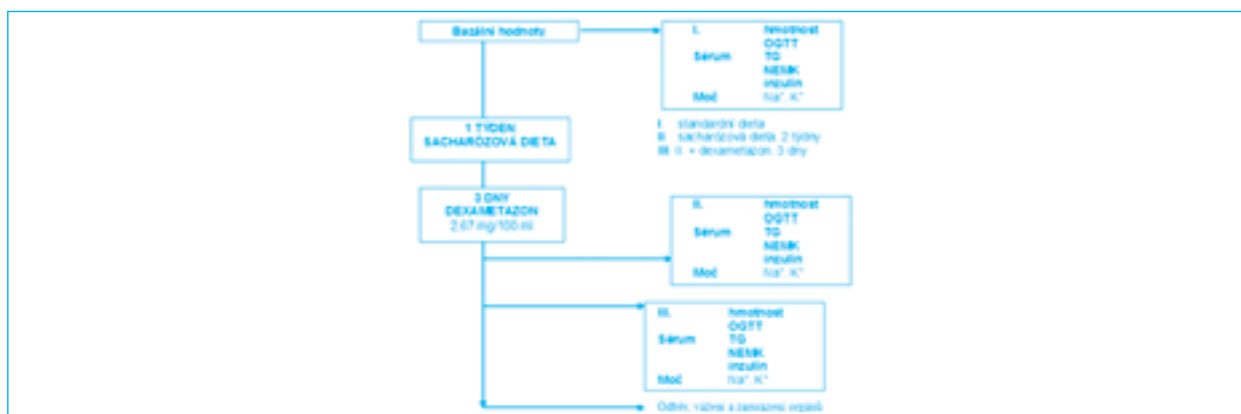
Kongenní kmen BN.SHR-II6/Cd36 (BN.SHR4), Rat Genome Database ID 728142, byl vytvořen vnesením segmentu chromozómu 4 SHR původu na genetické pozadí kmene BN/Cub. Kmen BN.SHR4 vykazuje řadu atributů metabolického syndromu ve srovnání s progenitorovým kmenem BN (Šeda et al., 2002) a má rovněž specifický farmakogenomický profil (Šeda et al., 2003).

Segregující populace. Křížením potkanů kmenů PD/Cub x BN/Cub a PD/Cub x BN.SHR4 a následným vzájemným křížením první filialní generace byly vytvořeny dvě skupiny zvířat druhé filialní generace (F2, segregující populace). Pro účely experimentálního protokolu byly použity jen samci; n = 149 pro F2 PD/Cub x BN/Cub a n = 94 pro F2 PD/Cub x BN.SHR4. Genetický pool těchto dvou skupin se liší pouze v definovaném úseku chromozomu 4.

Metabolický protokol. Na základě výsledků pilotní studie, která ukázala výrazný rozdíl mezi reakcí na podání diety o vysokém obsahu sacharózy a dexametazonu mezi kmeny PD/Cub a BN/Cub, resp. BN.SHR4, byl vypracován experimentální protokol pro fenotypizaci segregujících populací PD/Cub x BN/Cub a PD/Cub x BN.SHR4. Jeho schéma s indikací časové posloupnosti měření zobrazuje obr. 1. Tomuto protokolu bylo podrobena 243 samců segregujících populací ve stáří 10 měsíců. Bylo stanoveno na 48 přímo měřených základních fenotypů (což odpovídá více než 3300 přímým měřením) a 35 fenotypů odvozených. Tato měření nadále sloužila jako výchozí soubor dat pro analýzu.

Genotypizace. Aby bylo možné provést genotypizaci obou F2 populací, bylo nejprve nutné nalézt sadu markerů polymorfních mezi kmeny progenitorů, tedy PD/Cub a BN/Cub, resp. PD/Cub a BN.SHR4. V rámci tohoto přípravného kroku bylo otestováno více než 1000 mikrosatelitních markerů, z nichž u 330 byl zjištěn hledaný polymorfismus. Z této sady bylo vybráno 220 markerů, které pokrývaly rovnoměrně celý genom potkana v intervalech 10-15 cM.

Vazebná analýza. Pro provedení diferencíální vazebné analýzy pomocí intervalového mapování byl použit program MapManager (v.b20) u obou segregujících populací.



OBR.1. SCHEMA FENOTYPIZAČNÍHO PROTOKOLU F2 POPULACÍ.

OGTT...orální glukózový toleranční test, TG...triglyceridémie, NEMK...neesterifikované mastné kyseliny.



OBR.2. DIFERENCIÁLNÍ VAZEBNÁ ANALÝZA KOMPONENT METABOLICKÉHO SYNDROMU VE 2 F2 POPULACÍCH. SYMBOLY KRUHU, ČTVERCE A TROJÚHELNÍKA JSOU OZNAČENA MÍSTA NÁLEZU SIGNIFIKANTNÍ VAZBY S DANOU SKUPINOU FENOTYPŮ – QTL.

VÝSLEDKY

Signifikantní rozdíly byly patrné už z výsledků fenotypizace (hladina glykémie, triglyceridů po sacharózové dietě a dexa-metazonu). Identifikovali jsme několik desítek genomických lokusů vykazujících signifikantní vazbu s některým ze zjišťo-vaných atributů metabolického syndromu u obou populací. Na základě diferencíální vazebné analýzy – bylo pro populaci PDxBN identifikováno cca 24 signifikantní i sugestivních lokusů na Ch. 3,7,8, a 17, zatímco v populaci PDxBN.SHR4 bylo vyhodnoceno celkem 22 lokusů převážně s lokalizací na Ch. 1,8,10 a 18. (Obr. 2). Řada z těchto asociací nebyla dosud v literatuře popsána. Ačkoli některé QTL (lokusy kvantitativních znaků) jsou konkordantní pro obě populace, většina prokazuje diskordanci pro sledované znaky. Příkladem konkordance je marker D1Wox22 (též Igf2 = insulin-like growth factor II) – signifikantní LOD score 4,0 pro populaci PDxBN a LOD score 4,9 pro PDxBN.SHR4 ovlivňující relativní hmotnost ledvin (avšak v populaci PDxBN.SHR4 též relativní hmotnost jaterní tkáně a hladinu neestriřikovaných mast-ných kyselin).

DISKUSE A SHRNUTÍ

Z komplexního posunu genetické architektury složek metabolického syndromu můžeme usuzovat na významný epista-tický model účinku minor genů, které se vyskytují jen za daných specifických podmínek (věk, prostředí, dieta, medikace) a významně modulují genotypickou odpověď konstitutivní exprese major genů. Mají-li obě populace jinak stejné gene-tické pozadí a jediným rozdílem je vnesený diferencíální segment SHR4, je tento úsek klíčovým činitelem přestavby genetické architektury metabolického syndromu.

Vnesení definovaného úseku chromozómu 4 SHR původu do sestavy dvou segregujících populací nám tedy umožnilo mapovat jeho roli a vliv na posun genetické architektury metabolického syndromu v modelovém systému. Hlavním přínosem této studie je zjištění, že i poměrně nevelká změna v genetickém fondu segregujících populace může mít zásadní význam na genetickou determinaci fenotypů souvisejících s metabolickým syndromem a navíc charakter této změny je komplexní, neváže se zdaleka jen na genomickou oblast, která je odlišná ve dvou srovnávaných populacích.

Tato studie byla podpořena granty: GAČR 301/04/0248, GAAV ČR B5105401, IGA MZ NR/7888, MSM 0021620807CIHR MT-14654, GEI-53958

LITERATURA

1. Křen V. (1975): *Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, Rattus norvegicus*. Acta Univ. Carol. Med. Praha (Monogr.) 68, 1-103.
2. Kwitek AE, Jacob HJ, Baker JE, Dwinell MR, Forster HV, Greene AS, Kunert MP, Lombard JH, Mattson DL, Pritchard KA Jr, Roman RJ, Tonellato PJ, Cowley AW Jr. (2006): *BN phenome: detailed characterization of the cardiovascular, renal, and pulmonary systems of the sequenced rat*. Physiol Genomics. 25, 303-13.
3. Šeda O., Kazdová L., Křenová D., Křen V. (2003): *Rosiglitazone fails to improve hypertriglyceridemia and glucose tolerance in CD36-deficient BN.SHR4 congenic rat strain*. Physiol Genomics 12, 73-78.
4. Šeda O., Kazdová L., Křenová D., Křen V. (2002): *Rosiglitazone improves insulin resistance, lipid profile and promotes adiposity in genetic model of metabolic syndrome X*. Folia Biol (Praha) 48, 237-241.
5. Šeda O., Šedová L., Kazdová L., Křenová D., Křen V. (2002): *Metabolic characterization of insulin resistance syndrome feature loci in three Brown Norway-derived congenic strains*. Folia Biol (Praha) 48, 81-88.
6. Šedová L., Kazdová L., Šeda O., Křenová D., Křen V. (2000): *Rat inbred PD/Cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance* Folia Biol (Praha) 46, 99-106.
7. Šedová L., Šeda O., Křenová D., Křen V., Kazdová L. (2004): *Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome*. Int J Obes Relat Metab Disord 28, 719-725.
8. Vrána A., Kazdová L., Dobešová Z., Kuneš J., Křen V., Bílá V., Štolba P., Klimeš I. (1993): *Triglyceridemia, gluco-regulation, and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrates*. Ann NY Acad Sci 683, 57-68.



Předávání cen v Akademickém klubu 1. LF UK – zleva Iva Ullmanová a prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.



Předávání cen v Akademickém klubu 1. LF UK. Na snímku shora Štěpán Sulek a děkan 1. LF UK. Na dolním snímku s děkanem 1. LF UK Kristýna Mášová.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ KLINICKÁ ČÁST
VÍTĚZNÉ PRÁCE



VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO SEKCE PREGRADUÁLNÍ – ČÁST KLINICKÁ

1. místo: **Sulek Štěpán, 5. r.**

Školitel: doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc.

Název práce: „Polymorfismy genů pro adiponectin a resistin u pacientek s mentální anorexií a obezitou – pilotní studie“

2. místo: **Kusák Pavel, 6. r.**

Školitel: MUDr. Luděk Peřinka, CSc.

Název práce: „Úroveň endodontického ošetření obyvatel České republiky a jeho vliv na onemocnění periapikálních tkání“

3. místo: **Mášová Kristýna, 4. r.**

Školitelky: prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc., prim. RNDr. Ivana Janatová, MUDr. Karin Malíčková

Název práce: „Protilátky proti fosfatidylethanolaminu (aPe) u pacientů s trombózami“

3. místo: **Švancarová Radka, 4. r.**

Školitelky: prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc., prim. RNDr. Ivana Janatová, MUDr. Karin Malíčková

Název práce: „Protilátky proti Annexinu V jako rizikový faktor opakovaných spontánních potratů“



1. MÍSTO

POLYMORFISMY GENŮ PRO ADIPONECTIN A RESISTIN U PACIENTEK S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ A OBEZITOU – PILOTNÍ STUDIE

Autoři: Štěpán Sulek, Markéta Dolinková, Zdena Lacinová, Jarmila Křížová, Martin Haluzík

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



Štěpán Sulek

ABSTRAKT

Východisko: Adiponectin a resistin jsou adipocytární hormony, které mohou mít souvislost s obezitou a inzulínovou resistencí. Jejich geny představují nové kandidátní geny inzulínové resistance a diabetes mellitus 2. typu. Cílem studie bylo stanovit četnost jednonukleotidových polymorfismů 45T>G a 276T>G adiponectinového genu a 62G>A a -180C>G resistinového genu u pacientek s obezitou, mentální anorexií a u štíhlých žen a porovnat vliv jednotlivých genotypů na koncentrace sledovaných hormonů.

Metody a výsledky: Byly stanoveny hladiny adiponectinu, resistinu, TNF-alfa a inzulínu a byla provedena DNA analýza u 17 mentálních anorektiček, 51 obézních a 17 štíhlých žen. Polymorfismy byly detekovány polymerázovou řetězovou reakcí s následnou restriční analýzou PCR produktu. Koncentrace adiponectinu byly nejnižší u obézních a nejvyšší u mentálních anorektiček. Hladiny resistinu byly nejnižší u mentálních anorektiček a nejvyšší u obézních. Při rozdělení probandů uvnitř skupin podle genotypů jednotlivých polymorfismů nebyly zjištěny rozdíly ve sledovaných parametrech. Pouze u kontrolní skupiny byl BMI významně vyšší u G/G genotypu než u nosičů alely T v pozici 276 adiponectinového genu (23,48±0,85 vs. 19,7±0,95, p<0,05). U mentálních anorektiček byla vyšší frekvence alely G u polymorfismu RETN -180 ve srovnání s kontrolami (p<0,04).

Závěry: Polymorfismy 45T>G a 276T>G ADP genu a 62G>A a -180C>G RETN genu neměly vliv na sérové koncentrace ADP a RETN. U štíhlých žen byl BMI ovlivněn přítomností alely T v pozici 276 ADP genu. Mentální anorektičky měly vyšší frekvenci alely G u polymorfismu RETN -180 oproti zdravým ženám.

Klíčová slova: adiponectin, resistin, polymorfismus, obezita, mentální anorexie

ÚVOD

Adiponectin (ADP) a resistin (RETN) jsou nedávno objevené hormony produkované tukovou tkání. Předpokládá se, že by mohly mít souvislost s obezitou a inzulínovou resistencí.

Adiponectin je tvořen výhradně v tukové tkáni a to ve vyšších kvantech než ostatní hormony (vč insulínu a leptinu). S množstvím tukové tkáně jeho hladina klesá. Jeho hladiny jsou sníženy u pacientů s obezitou a diabetem 2. typu^(1, 2). Podávání rekombinantního ADP snižuje glykémii u normálních i diabetických potkanů bez zvýšení inzulínemie a výrazně zvyšuje schopnost inzulínu blokovat glukoneogenezi v játrech⁽³⁾. Myši s knockoutem genu pro adiponectin se vyznačují inzulínovou resistencí a akcelerovanou aterosklerózou⁽⁴⁾.

Resistin je proteinový hormon, jehož hladiny jsou vyšší u genetických experimentálních modelů obezity a u hlodavců s dietou-indukovanou obezitou. Podávání resistinu myším zhoršuje glukózovou toleranci a působení inzulínu; podání neutralizující protilátky proti tomuto hormonu naopak zvyšuje inzulínovou senzitivitu⁽⁵⁾. Během hladovění se exprese resistinové mRNA snižuje⁽⁶⁾. Podávání RETN stimuluje produkci glukózy v játrech při isoinzulinemickém stavu a to glukoneogenezi a glykogenolýzou⁽⁷⁾. Údaje o změnách hladin resistinu a jejich souvislostí s obezitou a inzulínovou rezistencí u lidí jsou rozpornější než data experimentální. Někteří autoři zpochybňují souvislost mezi RETN a inzulínovou resistencí, v některých publikacích např. nebyly popsány odlišné hladiny tohoto hormonu u obézních a štíhlých jedinců⁽⁸⁾. Geny pro RETN a ADP jsou považovány za nové kandidátní geny inzulínové resistance a diabetu mellitu 2. typu.

U obézních byly studovány polymorfismy pro oba tyto geny. Byla publikována řada prací o jednonukleotidových polymorfismech (SNP) adiponectinového genu 276G>T. Opakovaně bylo zjištěno, že se výskyt G alely v této pozici pojí s nižšími a výskyt T alely s vyššími hladinami ADP^(10, 11). Dále bylo zjištěno, že G/G genotyp SNP 276 je asociován s porušenou glukózovou tolerancí⁽¹²⁾. Stejní autoři také prokázali souvislost mezi přítomností alely G v pozici 45 a porušenou glukózovou tolerancí, v jiné práci asociace mezi tímto polymorfismem a inzulínovou resistencí zjištěna nebyla⁽¹³⁾. Menzaghi et al. zjistil, že genotyp 45G a 276T genu pro adiponectin těsně koreluje s řadou složek indikátorů inzulínové resistance (tělesná hmotnost, obvod pasu, HOMA index, poměr celkového a HDL cholesterolu)⁽¹⁴⁾.

Výsledky analýzy resistinového genu u obézních byly publikovány v několika pracích. U polymorfismu genu pro resistin 62G>A byla prokázána u diabetiků 2. typu v čínské populaci nižší frekvence alely A než u nediabetiků. Diabetici s GG genotypem měli navíc vyšší prevalenci arteriální hypertenze. Tento polymorfismus autoři považují za nezávislý rizikový faktor DM 2. typu a arteriální hypertenze⁽¹⁵⁾. Obdobnou studii prezentovali autoři z Německa⁽¹⁶⁾, kteří nepotvrdili

rozdíl ve výskytu alely A u diabetiků a nediabetiků. Jednonukleotidovým polymorfismem -180C>G v promotorové oblasti resistinového genu se zabývá pouze jediná práce. GG homozygoté měli signifikantně vyšší hladiny resistinové mRNA v abdominálním podkožním tuku, které pozitivně a nezávisle korelovaly s inzulínovou resistencí a množstvím tuku v játrech⁽¹⁷⁾.

Zatím nebyla publikována práce, která by sledovala zmíněné polymorfismy u pacientek s mentální anorexií.

Cílem naší studie bylo sledovat polymorfismy +45T>G a +276T>G adiponektinového genu a +62G>A a -180C>G resistinového genu v české populaci u obézních a mentálních anorektiček v porovnání se štíhlými ženami a porovnat vliv jednotlivých genotypů na sérové koncentrace sledovaných hormonů. Změny v sérových koncentracích uvedených hormonů indukované výše uvedenými polymorfismy by totiž mohly vysvětlit řadu metabolických odchylek nalézáných u pacientek s obezitou respektive mentální anorexií.

METODY

Bylo vyšetřeno 51 obézních žen, 17 mentálních anorektiček a 17 zdravých neobézních žen. Všem subjektům byla po celonočním hladovění odebrána krev, byly zváženy a změřeny, byl vypočítán body mass index (BMI). Všechny ženy podepsaly informovaný souhlas.

V krvi byly stanoveny hladiny adiponektinu, resistinu a TNF-alfa pomocí ELISA kitů (Linco Research, USA; BioVendor, ČR; R&D Systems, USA) a inzulínu pomocí RIA kitu (Immunotech, ČR).

Celková DNA byla izolována z 500ml nesrážlivé krve izolačním kitem MagNA Pure Nucleid Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Německo) na automatickém izolátoru MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Německo).

Vyizolovaná DNA byla použita pro stanovení 2 polymorfizmů genu pro adiponektin (45 T>G a 276 G>T) a 2 polymorfizmů genu pro resistin (62 G>A, -180 C>G).

Všechny výše uvedené polymorfismy byly detekovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) na přístroji MyCycler™ Thermo Cycler (Bio-Rad, USA) s následnou restrikční analýzou PCR produktu (RFLP).

Reakční směs PCR pro všechny polymorfismy obsahovala 2x PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR), forward primer a reverse primer, PCR H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR) a 150ng DNA. Produkty PCR a restrikční analýzy byly detekovány na 2% agarózovém gelu s 1% ethidium bromidem. Sekvence všech PCR produktů byla ověřena enzymatickou sekvenací na přístroji ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA).

Statistická analýza byla provedena pomocí programu SigmaStat (Jandel Scientific, USA). Ze získaných dat byly vypočítány průměry a standardní chyby. Významnost rozdílů mezi skupinami byla stanovena nepárovým t-testem nebo Mann-Whitney Rank Sum testem. Rozdíly ve výskytu jednotlivých polymorfismů byly hodnoceny frekvenční analýzou, Fischerovými exaktními testy a chi-kvadrát testem.

VÝSLEDKY

Koncentrace ADP byly statisticky významně nižší u obézních žen v porovnání s kontrolní skupinou a mentálními anorektičkami, oproti zdravým ženám měly mentální anorektičky tyto hladiny výrazně vyšší. Koncentrace RETN byly nejnižší u mentálních anorektiček a nejvyšší u obézních. Hladiny inzulínu byly statisticky významně vyšší u obézních oproti kontrolní skupině i mentálním anorektičkám. Koncentrace TNF- α se mezi jednotlivými skupinami nelišily. (Tabulka 1)

Při rozdělení probandů uvnitř skupin podle genotypů jednotlivých polymorfismů nebyly zjištěny rozdíly v BMI a hladinách ADP, RETN, inzulínu a TNF- α . Pouze u kontrolní skupiny se lišil BMI u G/G genotypu a nosičů alely T v pozici 276 adiponektinového genu ($p=0,017$).

TABULKA 1 BODY MASS INDEX (BMI), HLADINY ADIPONEKTINU (ADP), RESISTINU (RETN), INZULÍNU A TUMOR NECROSIS FACTORU-ALFA (TNF-A) U PACIENTEK S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ, OBEZITOU A KONTROLNÍ SKUPINY ZDRAVÝCH ŠTÍHLÝCH ŽEN.

	Mentální anorektičky	Obézní ženy	Kontrolní skupina
N	17	51	17
BMI (kg/m ²)	15,4±0,45**+++	45±1,60**°°	22,2±0,79++°°
ADP (mg/ml)	57,8±6,33*+++	18,7±1,75*°°	33,0±6,79+°
RETN (ng/ml)	3,7±0,29*+++	6,8±0,35*°°	5,42±0,53+°
Inzulín (mIU/ml)	16,4±1,68+	33,5±3,48*°	17,1±3,10+
TNF- α (ng/ml)	2,0±0,87	2,67±1,06	0,85±0,13

Výsledky jsou uvedeny jako průměry \pm SEM

*statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p<0,05$)

**statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p<0,001$)

+statisticky významný rozdíl oproti obézním ženám ($p<0,05$)

++ statisticky významný rozdíl oproti obézním ženám ($p<0,001$)

° statisticky významný rozdíl oproti mentálním anorektičkám ($p<0,05$)

°° statisticky významný rozdíl oproti mentálním anorektičkám ($p<0,001$)



Při analýze polymorfismů bylo zjištěno, že alela G v lokusu 62 a alela C v lokusu -180 genu pro resistin a alela T v lokusu 45 a alela G v lokusu 276 genu pro adiponectin byly zastoupeny výrazně častěji než alely A, G, G a T v odpovídajících lokusech (RETN 62: $p < 0.0001$, RETN -180: $p < 0.0002$, ADIPO 45: $p < 0.0001$, ADIPO 276: $p < 0.0001$).

Na hranici významnosti byla korelace mezi nosičstvím alely G u polymorfismu RETN -180 a diagnózou anorexie ve srovnání s kontrolami ($p = 0.06$, Fisherův exaktní test; $p < 0.04$ chi-kvadrát test).

Mezi jednotlivými polymorfismy nebyl zjištěn statisticky významný vztah, vazba blízcí se významnosti byla pouze mezi polymorfismy RETN 62 a RETN -180 ($p < 0.07$, chi-kvadrát test; $p < 0.06$, frekvenční analýza).

DISKUZE

Cílem naší studie bylo stanovit četnost polymorfismů 45T>G a 276T>G adiponectinového a 62G>A a -180C>G resistinového genu v české populaci u pacientek s obezitou a mentální anorexií v porovnání se štíhlými ženami a posoudit vliv jednotlivých genotypů na sérové koncentrace sledovaných hormonů. Bylo zjištěno, že hladiny adiponectinu jsou nejvyšší u mentálních anorektiček a nejnižší u obézních žen, hladiny resistinu jsou u nemocných s mentální anorexií nejnižší, u obézních naopak nejvyšší. Tato zjištění jsou v souladu s dříve publikovanými pracemi i našimi dřívějšími výsledky^(1, 5, 18, 19, 20).

V naší práci nebyl nalezen vliv přítomnosti jednotlivých alel na sledované parametry, kromě vztahu mezi G/G genotypem ADP genu v pozici 276 a vyšším BMI u neobézních žen. Toto pozorování je v částečném rozporu s prací Fredrikssona, který zjistil, že obézní nosiči alely T mají vyšší obsah tuku v organismu než obézní s genotypem G/G⁽¹⁰⁾. Vliv polymorfismů na hladiny ADP nebo RETN nebyl v naší práci zjištěn na rozdíl od některých dříve publikovaných výsledků. Například Hara et al. popsal u osob s BMI nad 26,7 kg/m² s G alelou v pozici 276 nižší hladiny ADP⁽⁹⁾. Nosiči alely T v pozici 276 měli vyšší expresi adiponectinové mRNA ve viscerálním tuku, která korelovala s hladinami ADP⁽¹⁰⁾. V jiné práci byl G/G genotyp SNP 276 ADP genu asociován se sníženými hladinami ADP⁽¹¹⁾. Byla prokázána souvislost mezi polymorfismy promotorové oblasti RETN genu (-420C>G a -537A>C) a plasmatickými koncentracemi resistinu⁽¹⁴⁾.

Zcela novým zjištěním naší práce je vyšší frekvence alely G v lokusu -180 RETN genu u mentálních anorektiček ve srovnání se zdravými ženami. Práce o polymorfismech genů pro adiponectin a resistin zatím nebyly u nemocných s touto diagnózou publikovány.

Naše výsledky jsou nepochybně ovlivněny malým počtem subjektů v jednotlivých skupinách a je nutné je považovat za pilotní. Zejména u skupiny pacientek s mentální anorexií jde však o zcela originální dosud nepublikované údaje. Předpokládáme, že po rozšíření množství pacientů v jednotlivých skupinách mohou naše výsledky dále přispět k objasnění úlohy endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogeneze metabolických komplikací obezity a mentální anorexie.

ZÁVĚR:

Polymorfismy 45T>G a 276T>G ADP genu a 62G>A a -180C>G RETN genu neměly vliv na sérové koncentrace ADP a RETN.

U štíhlých žen byl BMI ovlivněn genotypem v pozici 276 ADP genu.

Mentální anorektičky měly vyšší frekvenci alely G u polymorfismu RETN -180 oproti zdravým ženám.

LITERATURA

1. Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, Apr 2;257(1):79-83.
2. Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y.: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000 Jun;20(6):1595-9.
3. Berg, AH., Combs, TP., Du, X., Brownlee, M., Scherer, PE.: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.*, 2001 Aug;7(8):947-53.
4. Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., Noda, T.: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*, 2002 Jul 19;277(29):25863-6.
5. Stepan, CM., Bailey, ST., Bhat, S., Brown, EJ., Banerjee, RR., Wright, CM., Patel, HR., Ahima, RS., Lazar, MA.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001 Jan 18;409(6818):307-12.
6. Kim, KH., Lee, K., Moon, YS., Sul, HS.: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2001 Apr 6;276(14):11252-6.
7. Rajala, MW., Obici, S., Scherer, PE., Rossetti, L.: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*, 2003 Jan;111(2):225-30.
8. Lee, JH., Chan, JL., Yiannakouris, N., Kontogianni, M., Estrada, E., Seip, R., Orlova, C., Mantzoros, CS.: Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin adminis-

- tration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003 Oct;88(10):4848-56
9. Hara, K., Boutin, P., Mori, Y., Tobe, K., Dina, C., Yasuda, K., Yamauchi, T., Otabe, S., Okada, T., Eto, K., Kadowaki, H., Hagura, R., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Nagai, R., Taniyama, M., Matsubara, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tomita, M., Kimura, S., Ito, C., Froguel, P., Kadowaki, T.: Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes*, 2002 Feb;51(2):536-40.
 10. Fredriksson, J., Carlsson, E., Orho-Melander, M., Groop, L., Ridderstrale, M.: A polymorphism in the adiponectin gene influences adiponectin expression levels in visceral fat in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*, 2005 Oct 11;
 11. Gonzalez-Sanchez, JL., Zabena, CA., Martinez-Larrad, MT., Fernandez-Perez, C., Perez-Barba, M., Laakso, M., Serrano-Rios, M.: An SNP in the adiponectin gene is associated with decreased serum adiponectin levels and risk for impaired glucose tolerance. *Obes Res*, 2005 May;13(5):807-12.
 12. Filippi, E., Sentinelli, F., Trischitta, V., Romeo, S., Arca, M., Leonetti, F., Di Mario, U., Baroni, MG.: Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *Eur J Hum Genet*, 2004 Mar;12(3):199-205.
 13. Menzaghi, C., Ercolino, T., Di Paola, R., Berg, AH., Warram, JH., Scherer, PE., Trischitta, V., Doria, A.: A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 2002 Jul;51(7):2306-12.
 14. Cho, YM., Youn, BS., Chung, SS., Kim, KW., Lee, HK., Yu, KY., Park, HJ., Shin, HD., Park, KS.: Common genetic polymorphisms in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentrations in humans. *Diabetologia*. 2004 Mar;47(3):559-65.
 15. Tan, MS., Chang, SY., Chang, DM., Tsai, JC., Lee, YJ.: Association of resistin gene 3'-untranslated region +62G->A polymorphism with type 2 diabetes and hypertension in a Chinese population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Mar;88(3):1258-63.
 16. Gouni-Berthold, I., Giannakidou, E., Faust, M., Kratzsch, J., Berthold, HK., Krone, W.: Resistin gene 3'-untranslated region +62G->A polymorphism is associated with hypertension but not diabetes mellitus type 2 in a German population. *J Intern Med*. 2005 Dec;258(6):518-26.
 17. Smith, SR., Bai, F., Charbonneau, C., Janderova, L., Argyropoulos, G.: A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1611-8.
 18. Delparte, ML., Brichard, SM., Hermans, MP., Beguin, C., Lambert, M.: Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Jan;58(1):22-9.
 19. Brichard, SM., Delparte, ML., Lambert, M.: Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm Metab Res*. 2003 Jun;35(6):337-42.
 20. Housova, J., Anderlova, K., Krizova, J., Haluzikova, D., Kremen, J., Kumstyrova, T., Papezova, H., Haluzik, M.: Serum adiponectin and resistin concentrations in patients with restrictive and binge/purge form of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Mar;90(3):1366-70.
 21. Xita, N., Georgiou, I., Tsatsoulis, A., Kourtis, A., Kukuvtis, A., Panidis, D.: A polymorphism in the resistin gene promoter is associated with body mass index in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004 Nov;82(5):1466-7.

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno grantem Grantové agentury České republiky 301/04/P167.

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adiponectin
BMI	body mass index
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
RETN	resistin
RFLP	restrikční analýza PCR produktu
RNA	ribonukleová kyselina
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TNF-alfa	tumor necrosis faktor alfa



2. MÍSTO

ÚROVEŇ ENDODONTICKÉHO OŠETŘENÍ OBYVATEL ČESKÉ REPUBLIKY

Autor: Pavel Kusák

Školitel: as. MUDr. Luděk Peřinka, CSc., Stomatologická klinika 1. LF UK

Přednosta: prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc.



Pavel Kusák

ÚVOD

- Rozvoj moderní stomatologie se projevila ve všech jejích odvětvích, včetně endodoncie.
- Ošetření kořenových kanálků se díky novým materiálům a vylepšeným postupům stalo obecně snazší a spolehlivější.
- Hlavním cílem naší studie bylo získat přehled o úrovni endodontického ošetření občanů České republiky.
- Vedlejším úkolem bylo prokázat souvislost mezi kvalitou endodontického ošetření a onemocněním periapikálních tkání.
- Výsledky jsme porovnali se studii v zahraničí.

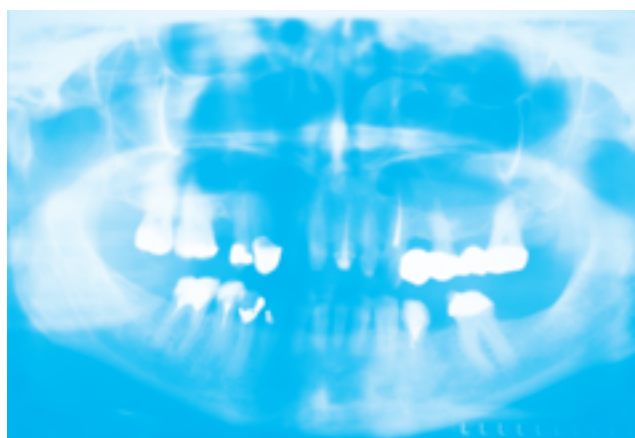
MATERIÁL A METODIKA

Materiál:

- Hodnoceny byly ortopantomografické (OPG) rentgenové snímky, zachycující ozubenou oblast horní a dolní čelisti.

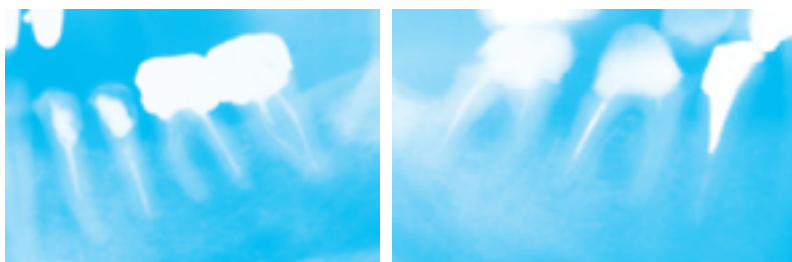


- Ve studii byly použity rtg snímky pacientů navštěvujících oddělení chirurgické a záchovné stomatologie stom. kliniky 1. LF UK.
- Snímky byly zhotoveny v roce 2000.



Metodika:

- Pacienti mladší 18 let a s méně než 10 vlastními zuby byli vyřazeni.
- M3 nebyly hodnoceny.
- Z celkového množství bylo vybráno 200 nejlépe čitelných rtg snímků.
- Materiál byl hodnocen nezávisle 2 autory.
- Jako endodonticky ošetřené byly hodnoceny všechny zuby s radioopákním materiálem v dřevné dutině nebo v kořenovém kanálku.



Kvalita ošetření byla stanovena podle vzdálenosti výplně od oblasti foramen physiologicum (dále f.f.).

Rozsah výplně:

- $E \ominus$ - výplň sahá > 3 mm od oblasti f.f.



- $E \oplus$ - výplň přesahuje oblast f.f.

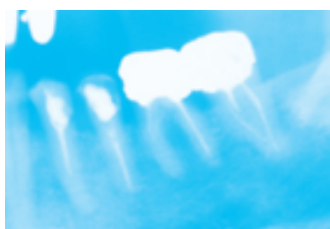


- E - na rtg sahá výplň do oblasti f.f.





- Dále byla hodnocena přítomnost zánětu v periapikální oblasti.



- Kritériem byla ztráta ostré hranice lamina corticalis kolem hrotu kořene nebo rozšíření periapikální štěrbin.



VÝSLEDKY

- Na 200 OPG celkem hodnoceno **4981** zubů
- z toho endodonticky ošetřeno **360** zubů **7.2%**
- Endo celkem 360 100%
- **E ⊖** - krátká kořen. výplň 281 78.1%
- **E ⊕** - dlouhá kořen. výplň 30 8.3%
- **E** - v oblasti f.f. **49** **13.6%**
- Periapikální zánět kořene endodonticky léčených zubů celkem: 187 51.9%
- **perio + E ⊖** 52.3%
- **perio + E ⊕** 83.3%
- **perio + E** 30.6%

Srovnání se studii v zahraničí:

Stát (rok)	endo (?)	Lege artis	perio + endo
ČR (2000)	7.2 (4981)	13.6	51.9
Norsko (1993)	1.3 (3282)	66.7	38.1
Holandsko (1988)	2.3 (4196)	49.4	39.2
Belgie (1997)	6.8 (4617)	40.7	40.4

ZÁVĚR

Výsledky studie:

1. zubů s endodontickým ošetřením **7.2%**
2. z toho non lege artis **86.4%**
3. ze všech endod. ošetřených onemocnělo periapikálním zánětem **51.9%**

3. MÍSTO

PROTILÁTKY PROTI FOSFATIDYLETHANOLAMINU (APE) U PACIENTŮ S TROMBÓZAMI

Autor: Kristýna Mášová, 4. ročník 1.LF UK

Školitelé: MUDr. Karin Malíčková, prim. RNDr. Ivana Janatková, prof. MUDr. Terezie Fučíková DrSc., Klinická imunologie a alergologie – laboratoř, ÚKBLD 1. LF a VFN



Kristýna Mášová

TROMBÓZA

Trombóza je onemocnění postihující tepennou či žilní část cévního systému jakékoliv velikosti a v jakékoli lokalitě, které vzniká kompletním či partiálním uzavěrem cévy trombem. Různé klinické projevy jsou závislé na lokalizaci a rozsahu trombosy. Arteriální trombosa tak může vyústit v akutní ischemii a manifestovat se například jako AIM, CMP, TIA či kritická končetinová ischemie. Žilní trombosa je nejčastěji lokalizovaná v žilách dolních a horních končetin, žilách viscerálních orgánů či mozkových cév. Dalším a často prvním projevem trombózy je plicní embolie, podle některých studií i Guillain-Barré syndrom, chorea, migrény a epilepsie.

Patofyziologický mechanismus tepenných a žilních trombóz je sice odlišný, nicméně společným jmenovatelem mohou být některé hyperkoagulační stavy, např. antifosfolipidový syndrom.

Antifosfolipidový syndrom (APS)

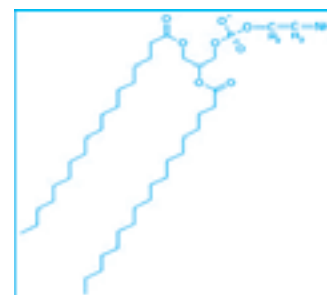
APS (primární či sekundární) je systémové autoimunitní onemocnění, které je klinicky charakterizováno recidivujícími trombózami a/nebo opakovanými spontánními potraty a/nebo trombocytopenií. V laboratoři je definován přítomností antifosfolipidových protilátek a/nebo průkazem lupus antikoagulans. Výskyt APS v ČR je v současné době odhadován na 2000 obyvatel.

Antifosfolipidové protilátky (APLA) nejsou namířeny přímo vůči fosfolipidům, ale vůči jejich kofaktorům (β 2GP1, protrombin, annexin V nebo HMWK, LMWK, f XI, prekallikrein). Vzájemný vztah APLA, fosfolipidů a kofaktorů popisuje teorie konformačních změn. Ta říká, že po navázání fosfolipidu na svůj kofaktor dojde ke konformační změně kofaktoru a k odhalení kryptického antigenního neo-epitopu. Teprve vůči tomuto epitopu jsou namířeny vlastní antifosfolipidové protilátky.

K APLA patří protilátky proti fosfatidylserinu, fosfatidylcholinu, fosfatidylinositolu, kyselině fosfatidové, fosfatidylethanolaminu. APLA mohou být jednou z příčin trombofilních stavů nejspíše prostřednictvím svého vlivu na trombocyty (např. interference s ADP indukovanou agregací destiček), endotel (např. zásah do produkce antikoagulačního a antiagregačního prostacyklinu, poškození endotelu zánětem), antitrombin III (antiheparinová aktivita APLA), inhibitory hemostázy (např. porušení antikoagulačního efektu kofaktoru APLA β 2GP1) či urychlením procesu aterosklerózy (zvýšený influx oxidovaných LDL do makrofágů, rozvoj zánětu v subendoteliálních oblastech).

Fosfatidylethanolamin (PE)

Fosfatidylethanolamin (molekula PE obr. č. 1) je hlavní strukturální fosfolipid buněčných membrán savců. PE je dále součástí koagulační kaskády, kdy po vazbě na různé proteiny, které se také koagulace účastní, zvyšuje jejich antikoagulační a profibrinolytickou aktivitu. Pro příklad uveďme zvýšení antikoagulační aktivity aktivovaného proteinu C po vazbě s oxidovaným PE. V přítomnosti protilátek proti PE je tato funkce blokována a může dojít k trombózám.



OBR. Č.1: FOSFATIDYLETHANOLAMIN – MOLEKULA

CÍL PRÁCE

Protilátky pro fosfatidylethanolaminu (aPE) nepatří k rutinně stanovovaným APLA (protilátky proti fosfatidylserinu -aPS, β 2GP1 -a β 2GP1, kardiolipinu -aCL) při podezření na trombózu vzniklé na autoimunitním podkladě. Proto bylo cílem mé práce zjistit, zda jsou i aPE asociovány s trombózami.

METODIKA

Vyšetřila jsem 21 sér nemocných se systémovými autoimunitními chorobami (14 SLE, 5 PAPS, 1 WG, 1 SS), z nichž u 6 došlo v minulosti ke klinickým projevům tromboembolismu v souvislosti se základním onemocněním (hluboká žilní trombóza, transitorní ischemické ataky, chronická tromboembolická plicní hypertenze, postischemická epilepsie). Kont-



rolní skupinu tvořilo 19 sér mladých žen léčených pro neplodnost, s podezřením na imunopatologickou příčinu infertily. U žádné z nich nebyla nikdy prokázána tromboembolická příhoda. Vybraná séra byla analyzována na přítomnost aPE, aPS, aβ2GP1 a aCL v izotypu IgG a IgM.

Ke stanovení jmenovaných protilátek jsem použila metodu ELISA (diagnostická souprava AESKULISA Ethanolamine-GM, Německo).

STATISTICKÁ ANALÝZA

Data (tab. č.1 a tab. č.2) byla zpracována on-line statistickým softwarem VassarStats. Pro naměřené veličiny byl spočítán průměr, směrodatná odchylka, medián, minimum, maximum a 1. a 3. kvartil.

TAB. Č. 1: PACIENTI SE SYSTÉMOVÝM AUTOIMUNITNÍM, VÝSKYT POZITIVNÍCH AUTOPROTILÁTEK AEA, AB2GP1, ACL, APS

	Idg.	trombózy	aEA IgG	aEA IgM	aβ2GP1 IgG	aβ2GP1 IgM	aCL IgG	aCL IgM	aPS IgG	aPS IgM
pacient č.1	APS	chron. tromboembol. plicní hypertenze	83,7	1,0	55,5	0	>100	0	>100	0
pacientka č.2	WG	ne	2,0	2,1	0	0	0	0	0	0
pacientka č.3	SLE	Náb. zřít. trombóza, TIA, CHRF	38,7	7,0	0,0	14,1	10,5	18,0	8,5	10,2
pacientka č.4	APS	endokarditida	12,7	0,0	40,0	0	73,4	0	55,1	0
pacientka č.5	APS	epilepsie	8,0	6,3	25,3	>100	21,6	>100	14,50	>100
pacientka č.6	SLE	ne	12,9	0,8	0	0	0	0	0	0
pacientka č.7	SLE	ne	17,9	29,9	9,35	>100	83,7	>100	73,59	>100
pacientka č.8	SLE	ne	2,4	2,1	12,1	5,45	9,5	0,45	13,1	7,25
pacientka č.9	SLE	ne	1,0	0,0	0	0	0	0	0	0
pacientka č.10	SLE	ne	4,7	0,0	22,2	0	40,7	0	30,9	0
pacientka č.11	SLE	ne	1,7	3,4	0	0	0	0	0	0
pacient č.12	SLE	ne	29,5	1,5	0	0	0	0	0	0
pacient č.13	SLE	ne	11,2	7,3	34,6	9,4	86,2	18,2	67,6	11,4
pacientka č.14	SLE	ne	5,0	2,3	33,3	0	45,6	0	39,1	0
pacientka č.15	SLE	ne	0,9	1,5	0	0	0	0	0	0
pacientka č.16	SS	ne	11,4	10,3	0,0	20,6	7	40,7	5,53	20,1
pacientka č.17	APS	TIA	0,5	0,9	0	22,5	0	20,0	0	22,5
pacient č.18	APS	prim. plo. hypertenze	4,0	6,3	0	8,1	0	13,1	0	0
pacientka č.19	SLE	ne	5,5	1,7	8,4	0	57,2	0	56,4	0
pacientka č.20	SLE	ne	0,0	1,5	0	0	0	0	0	0
pacient č.21	SLE	ne	4,1	1,4	0,7	0	21,6	0	11,2	0

TAB. Č. 2: PACIENTI S NEPLODNOSTÍ, VÝSKYT POZITIVNÍCH AUTOPROTILÁTEK AEA, AB2GP1, ACL, APS

	trombózy	aEA IgG	aEA IgM	aβ2GP1 IgG	aβ2GP1 IgM	aCL IgG	aCL IgM	aPS IgG	aPS IgM
pacientka č. 22	ne	0,0	6,3	2,0	9,2	2,1	11,2	2,1	12,0
pacientka č. 23	ne	4,5	6,0	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 24	ne	1,0	0,0	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 25	ne	1,2	8,8	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 26	ne	1,2	1,8	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 27	ne	215,4	7,5	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 28	ne	3,0	2,9	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 29	ne	1,3	0,0	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 30	ne	2,2	4,1	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 31	ne	2,5	0,0	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 32	ne	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 33	ne	0,6	0,7	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 34	ne	1,8	3,7	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 35	ne	0,0	0,6	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 36	ne	0,4	1,1	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 37	ne	10,1	5,2	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 38	ne	7,5	0,0	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 39	ne	2,9	0,9	0	0	0	0	0	0
pacientka č. 40	ne	0,2	0,4	0	0	0	0	0	0

Vzhledem k tomu, že data nemají normální rozložení, byl pro srovnání dat mezi skupinami použit neparametrický Mann-Whitneyův U-test.

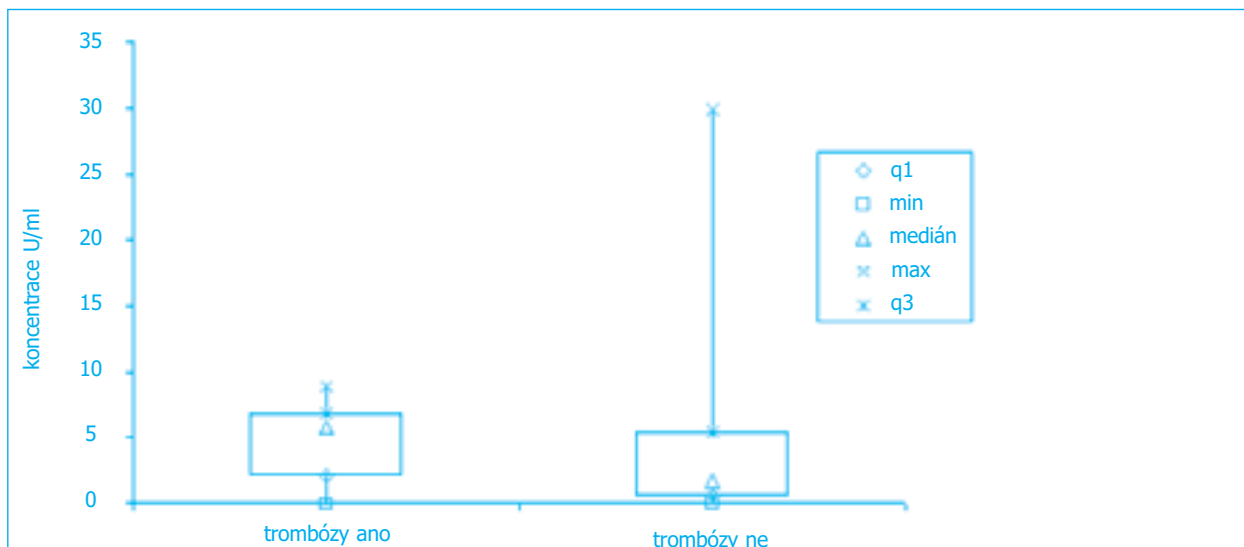
Nulovou hypotézu zamítáme na statistické hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro p-hodnotu menší než 0,05.

VÝSLEDKY

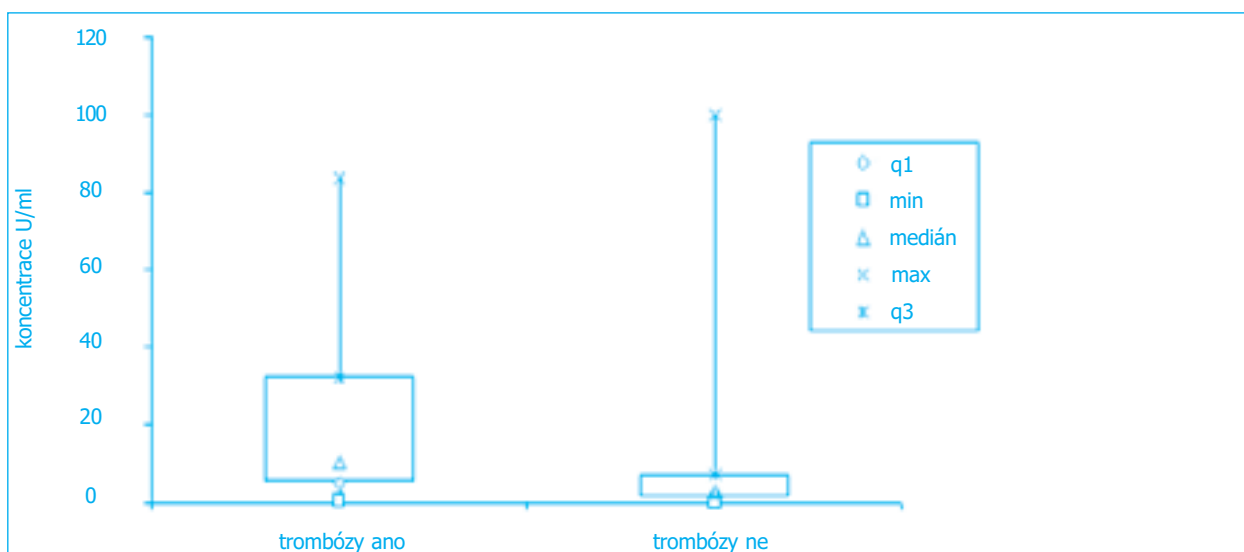
U pacientů s trombózami byly statisticky významně zvýšené hladiny **aPE** (pro IgG $p=0,05$, pro IgM $p=0,02$), **aPS** (pro IgG $p=0,05$, pro IgM $p=0,02$), **aβ2GP1** (pro IgG $p=0,03$, pro IgM $p=0,02$).

Hladiny **aCL** (pro IgG $p=0,06$, pro IgM $p=0,07$) nebyly ve skupinách pacientů s /bez trombóz významně statisticky odlišné.

Graficky jsou tyto výsledky znázorněny v grafech č.1 a č.2.



GRAF Č. 1: aEA (IgG)



GRAF Č. 2: aEA (IgM)

ZÁVĚR

Protilátky proti fosfatidylethanolaminu byly v izotypu IgG i IgM statisticky významně asociovány s trombózami. Dále vzhledem k tomu, že aPE mohou být jediné přítomné z antifosfolipidových protilátek, doporučuji zahrnout také je mezi rutinně vyšetřované APLA při podezření na trombózy autoimunitní patogeneze.

Z výsledků usuzuji, že by aPE mohly mít prediktivní charakter, což je třeba ověřit prospektivní studií.

LITERATURA

1. Karin Malíčková, Terezie Fučíková, Ivana Janatová, Antifosfolipidový syndrom, *Alergie*, 2001, číslo 4:320-324
2. John A. McIntyre and Dan R. Wagenknecht, Anti-phosphatidylethanolamine (aPE) Antibodies: a Survey, *Journal of Autoimmunity*, 2000, č.15:185-193
3. Toshitaka Sugi, Hidehiko Matsubayashi, Akifumi Inomo, Lu Dan and Tsunehisa Makino, Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss, *J.Obstet.Gynaecol. Res.*, 2004, Vol. 30, No. 4: 326-332
4. Sugi T., McIntyre JA., Certain autoantibodies to phosphatidylethanolamine (aPE) recognize factor XI and prekallikrein independently or in addition to the kininogens, *J. Autoimmun.*, 2001, 17 (3): 207-14
5. Makino T., Recurrent reproductive wastage and immunologic factors, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2002, 48 (4):266-268
6. Frayne J., Ingram C., Love S., Hall L., Localisation of phosphatidylethanolamine-binding protein in the brain and other tissues of the rat, *Cell Tissue Res.*, 1999, 298(3):415-23
7. Yetman DL, Kutteh WH., Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies, *Fertil Steril.*, 1996, 66(4):540-6



3. MÍSTO

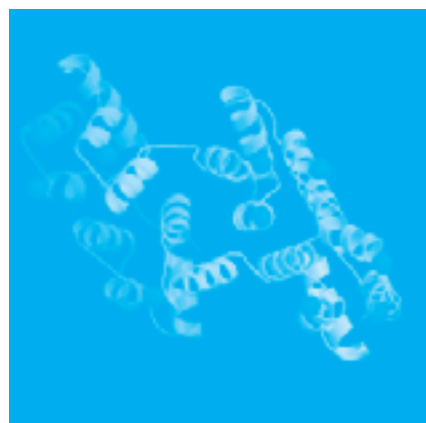
PROTILÁTKY PROTI ANNEXINU V JAKO RIZIKOVÝ FAKTOR OPAKOVANÝCH SPONTÁNNÍCH POTRATŮ

Radka Švancarová

Autor: Radka Švancarová, 4. roč. 1. LF UK**Školitelé:** prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc., prim. RNDr. Ivana Janatková, MUDr. Karin Malíčková, Klinická imunologie a alergologie – laboratoř, ÚKBLD 1. LF UK a VFN

Neplodnost postihuje jeden z pěti párů v reprodukčním věku. Přibližně u dvaceti procent z těchto případů je příčina imunologická. Opakované spontánní potraty mohou být (kromě jiného) následkem trombóz uteroplacentárních cév. Jednou z příčin vzniku těchto trombóz by mohla být nedostatečná funkce annexinu V.

Annexin V je protein složený z 320 aminokyselinových zbytků, jehož gen je lokalizovaný na krátkém raménku 4. lidského chromozomu. Je hojně zastoupený v endotelích umbilikálních cév a v placentě (250 mg/10 kg), ale jeho plasmatická koncentrace je nízká (0–5 ng/ml). Tento kalcium dependentní protein, izolovaný v polovině osmdesátých let z lidské krve pupečnickových arterií a z placent, je účinným inhibítorem na fosfolipidech závislých koagulačních reakcí. Působí jako kompetitivní inhibitor při vazbě koagulačních faktorů na fosfatidylserin exprimovaný na vnější vrstvě membrány syncytiotrofoblastu. Formuje jakýsi antitrombotický štít kolem negativně nabitého fosfatidylserinu a hraje tak zřejmě významnou roli při udržování normální funkce placenty. Protilátky proti annexinu V (AVAb) jsou proto spojovány se vznikem placentárních trombóz, apoptózou syncytiotrofoblastu a snížením sekrece hCG. Tyto protilátky byly poprvé objeveny před 12 lety u pacientů s SLE. U myšího modelu jejich infuze způsobila snížení dostupnosti annexinu V pro vazbu na fosfatidylserin exprimovaný na membráně syncytiotrofoblastu, což následně vedlo ke vzniku placentárních trombóz a ke ztrátě plodu. Zdá se, že tento mechanismus by se mohl uplatňovat i u lidí, a to především v době diferenciací trofoblastu, pro níž je charakteristická největší externalizace fosfatidylserinu.



Cílem mé práce bylo zjistit prevalenci sérových AVAb a jejich vztah k reprodukčnímu selhání u pacientek s/bez historie spontánních potratů v anamnéze. Dále jsem chtěla posoudit, zda je dosud stanovovaný panel autoprotištěk dostačující pro vyšetřování možných imunologických příčin opakovaných spontánních potratů, či zda by tímto prediktorem mohly být protilátky proti annexinu V.

Sbírala jsem séra pacientek s anamnézou opakovaných spontánních potratů a/nebo se selháním IVF, séra pacientů s SLE a/nebo APS. Následně jsem vyšetřila séra 6 pacientek s anamnézou jednoho nebo více spontánních potratů, které netrpí autoimunitní ani tromboembolickou chorobou; séra 7 pacientek s anamnézou jednoho nebo více spontánních potratů a autoimunitní nebo tromboembolickou chorobou; séra 13 pacientek s diagnózou neplodnost, bez spontánního potratu v anamnéze; a séra 9 pacientek se SLE a/nebo APS a žádným selháním reprodukce v anamnéze. Hlavním kritériem analýzy byla přítomnost/nepřítomnost spontánních potratů. Pacientky byly proto rozděleny na 2 skupiny – potrácející/nepotrácející - s cílem zjistit, zda se od sebe ve výskytu protilátek liší. Ve sledovaných sérech byly kromě IgG a IgM protilátek proti annexinu stanoveny také protilátky proti kardiolipinu, fosfatidylserinu a etanolaminu.

K detekci AVAb byla použita ELISA metoda. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je sendvičová kvantitativní metoda založená na reakci antigenu (zde AV) s protilátkou (zde IgG nebo IgM AVAb). Výsledkem ELISA testu je

TABULKA 1 VÝSLEDKY – PACIENTKY SE SPONTÁNNÍMI POTRATY

	AA IgG	AA IgM	AEA IgG	AEA IgM	a-B2GP1 IgG	a-B2GP1 IgM	ACL IgG	ACL IgM	APS IgG	APS IgM
pac.č.1	14,8	38,2	0	6,3	2	9,2	2,1	11,2	2,1	12,3
2	16,2	14	1,2	8,8	0	0	0	0	0	0
3	22,4	19	215,4	7,5	0	0	0	0	0	0
4	16,6	3,6	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
5	15,4	6,4	0,4	1,1	0	0	0	0	0	0
6	8,8	6,7	10,1	5,2	0	0	0	0	0	0
7	18,2	3,1	2	2,1	0	0	0	0	0	0
8	37,4	2,7	13,9	0,8	0	0	0	0	0	0
9	24,6	16,3	17,9	29,9	8,35	100	83,7	100	73,69	100
10	13,6	8,6	2,4	2,1	12,1	5,45	9,5	8,45	13,1	7,25
11	26,1	0	1,9	0	0	0	0	0	0	0
12	18,5	10,7	5	2,3	33,3	0	43,6	0	39,1	0
13	30,4	4	6,9	1,5	0	0	0	0	0	0

TABULKA 2 VÝSLEDKY – PACIENTKY BEZ SPONTÁNNÍCH POTRATŮ

	AA IgG	AA IgM	AEA IgG	AEA IgM	a-B2GP1 IgG	a-B2GP1 IgM	ACL IgG	ACL IgM	APS IgG	APS IgM
pac. č.1	14,8	38,2	0	6,3	2	9,2	2,1	11,2	2,1	12,3
2	16,2	14	1,2	8,8	0	0	0	0	0	0
3	22,4	19	215,4	7,5	0	0	0	0	0	0
4	16,6	3,6	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
5	15,4	6,4	0,4	1,1	0	0	0	0	0	0
6	8,8	6,7	10,1	5,2	0	0	0	0	0	0
7	18,2	3,1	2	2,1	0	0	0	0	0	0
8	37,4	2,7	13,9	0,8	0	0	0	0	0	0
9	24,6	16,3	17,9	29,9	8,35	100	83,7	100	73,69	100
10	13,6	8,6	2,4	2,1	12,1	5,45	9,5	8,45	13,1	7,25
11	26,1	0	1,9	0	0	0	0	0	0	0
12	18,5	10,7	5	2,3	33,3	0	43,6	0	39,1	0
13	30,4	4	6,9	1,5	0	0	0	0	0	0

barevná reakce. Spektrofotometrem se poté při 450 nm stanoví optická denzita, z níž se následně vypočte koncentrace specifické protilátky.

Po naměření všech optických denzit bylo zjištěno, že séra pacientek se spontánními potraty v anamnéze vykazovala signifikantně vyšší hladiny AVAb v třídě IgG v porovnání se séry pacientek bez potratů ($p=0,005$). Hladiny AVAb v třídě IgM, protilátek proti kardiolipinu, fosfatidylserinu a etanolaminu se v jednotlivých skupinách pacientek významně nelišily. Pro statistické zhodnocení byl použit Mann-Whitneyův neparametrický test.

Na základě výsledků mé práce se zdá, že anti-annexinové protilátky by mohly být lepším prediktorem opakovaných spontánních potratů než dosud vyšetřované protilátky proti kardiolipinu. Vzniká zde ale otázka, zda by protilátky proti annexinu V nemohly být pouze následkem opakovaných potratů. Tento problém by proto vyžadoval další zkoumání.

ZDROJE

1. Jacob H. Rand, M.D., Alan A. Arslan, MD, et al. Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2006) 194, 182-8
2. Gaetan Esposito, Mathieu C. Tamby, et al. Anti-annexin V antibodies: are they prothrombotic? *Autoimmunity Reviews* 4 (2005) 55-60
3. Hidehiko Matsubayashi, M.D., Ph.D., et al. Anti-annexin V antibodies in patients with early pregnancy loss or implantation failures. *Fertility and Sterility*, vol. 76 No.4, October 2001
4. T. Arai, H. Matsubayashi, et al. Anti-annexin A5 Antibodies in Reproductive Failures in Relation to antiphospholipid Antibodies and Phosphatidylserine. *American Journal of Reproductive Immunology* (2003), 50: 202-208
5. Nicoletta Di Simone, Roberta Castellani, et al. Monoclonal Anti-Annexin V Antibody Inhibits Trophoblast Gonadotropin Secretion and Induces Syncytiotrophoblast Apoptosis. *Biology and Reproduction* 65, 1766-1770 (2001)
6. C. Siaka, M. Lambert, et al. Faible prévalence des anticorps anti-annexine V dans le syndrome des antiphospholipides avec pertes fœtales. *PubMed online*
7. Junzo Nojima, Hirohiko Kuratsune, et al. Association between the Prevalence of Antibodies to Beta2-glycoprotein I, Prothrombin, Protein C, Protein S, and Annexin V in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Thrombotic and Thrombocytopenic Complications. *Clinical Chemistry*. 2001, 47: 1008-1015
8. Jacob H. Rand, M.D., Xiao-Xuan Wu, M.D., et al. Antiphospholipid immunoglobulin G antibodies reduce annexin-V levels on syncytiotrophoblast apical membranes and in culture media of placental villi. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1997), Vol. 177, No.4, 918-924

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY
VÍTĚZNÉ PRÁCE

YZ

56
SB



**VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY**

1. místo: **Panigaj Martin, Mgr.**

Školitel: Dr. Ing. Karel Holada

Název práce: „Expression of cellular prion protein on human erythrocytes“

2. místo: **Kolesová Hana, Mgr. – Anatomický ústav 1. LF UK**

Školitel: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

Název práce: „Influence of Sonic hedgehog onto the aortic arches development in avian emryos“

3. místo: **Křemen Jaromír, MUDr.**

Školitel: doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc.

Název práce: „Význam endokrinní funkce tukové tkáně u kriticky nemocných“

1. MÍSTO

EXPRESSION OF CELLULAR PRION PROTEIN (PRP^C) ON HUMAN RED BLOOD CELLS

Autor: Martin Panigaj, Adéla Broučková, Hana Glierová and Karel Holada, PRION LABORATORY, Institute of Immunology and Microbiology, 1st Medical Faculty, Charles University

Tutor: Karel Holada, Dr., Institute of Immunology and Microbiology



Martin Panigaj

Cellular prion protein (PrP^C) is protein expressed in various cell lines with the highest level of expression in neurons, particularly in brain. Attention of the scientist aimed at this protein is enhanced due to its involvement in Prion diseases, where together with its conformational altered form (PrP^{Sc}) play crucial role. Although PrP^C is protein of a great medical importance, its role in physiological processes remains enigmatic. Some experiments suggest that it could be involved in processes like prevention of apoptosis, copper metabolism linked to oxidative stress, signalization and differentiation. Not surprisingly scientists are focused mainly on PrP^C expressed in neurons, other cell populations such blood cells, immunocompetent cells etc. are not under such intensive research. Our laboratory is focused on the biology of PrP^C in blood system and its possible involvement in prion diseases.

As was already proved in laboratory animals, prion diseases could be experimentally transmitted via blood transfusion. In human there were recently 3 cases of variant Creutzfeld-Jacob disease (infectious member of prion diseases) transmission by blood transfusion. It emphasizes urgent need of donor screening test for prion diseases. Unfortunately pathological form of prion protein, PrP^{Sc}, is currently the only known specific marker of prion diseases. Its detection in blood is a great challenge. It is known that presence of normal cellular PrP^C is essential for propagation and amplification of PrP^{Sc}, because PrP^C serve as receptor/substrate for conversion of PrP^C to PrP^{Sc}. Thus tissues with expression of PrP^C are of a great interest. Blood contains substantial amount of normal PrP^C. Most of cell associated PrP^C in blood is in platelets (PLT). The situation is less clear with PrP^C on RBC. Others and we have previously shown that PrP^C is detectable on RBC by flow cytometry (FACS) but there are differences as for its quantity. One study reports minimal content of PrP^C (MacGregor et al., 1999) and one study even did not detect PrP^C on RBC (Barclay et al., 1999).

To verify these findings, we used quantitative FACS with fluorescein labeled monoclonal antibodies (MAbs) FH11, 3F4 and 6H4 against different parts of PrP^C molecule (PrP₂₃₋₈₅^C, PrP₁₀₉₋₁₁₂^C and PrP₁₄₄₋₁₅₂^C, respectively, FIG. 1).

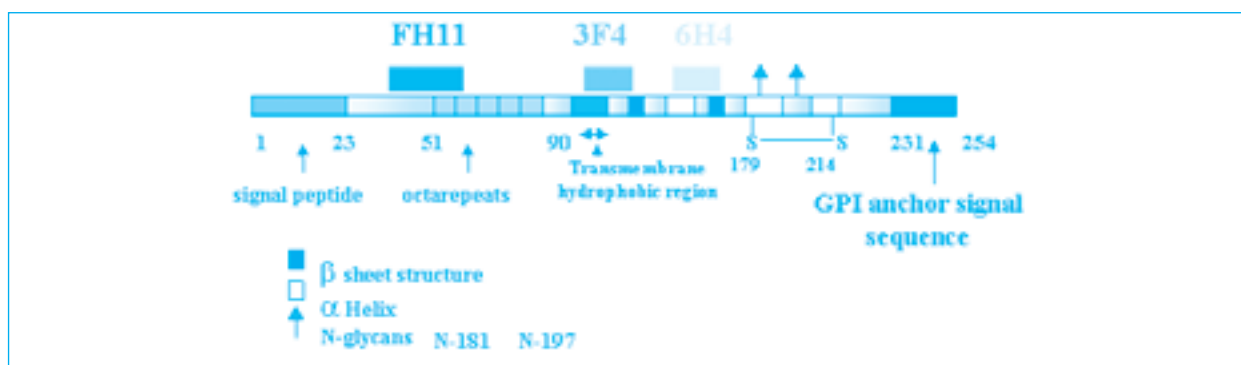


FIGURE 1. : SCHEMATIC STRUCTURE OF PRION PROTEIN AND EPITOPES FOR MAbs FH11, 3F4, 6H4

Prion protein before complete post-translational modification (adding of GPI-anchor and N-linked oligosaccharides, cleavage of N terminal 1-23 signal sequence and C terminal 231-254 signal peptide for GPI-anchor). Final product has molecular weight 30-35 kDa, which slightly differs due to the heterogeneity of oligosaccharides, bound in two positions – N181 and N197. Between positions C179 and C214 is disulfidic bond. C-terminus forms stable globular structure containing three α -helices on the other hand N-terminus is flexible formed structure.

Basis for the choice of these MAbs has its rationale in fact that they are widely used in prion research. Moreover, MAb 3F4 is employed in "hot candidate" for blood donor screening test- Conformation Dependent Immunoassay (CDI). Measurement was provided on RBC isolated from 8 healthy donors. We found striking differences in binding of the antibodies. While 6H4 detected almost 300 (113-557) molecules per cell, 3F4 and FH11 detected much less: 80 (33-137) and 36 (13-74) molecules per cell respectively. But on platelets mAb 3F4 recognizes PrP^C equally like 6H4. It is known that 3F4 epitope in PrP^{Sc} is hidden and is not so accessible like in normal molecule PrP^C. It suggests that PrP^C on RBC may resemble conformation of protease resistant PrP^{Sc}.

If PrP^C on RBC resemble by its conformation PrP^{Sc} then it may harbor the similar resistance to Proteinase K. Therefore we treated samples of PLT and RBC with increasing concentrations of proteinase K (1-50 mg/ml, 30 min., 0 °C). But

FACS analysis and Western blot showed gradual and complete cleavage of PrP^C on both PLT and RBC which means that RBC PrP^C probably is not alike PrP^{Sc} (FIG. 2 A and B).

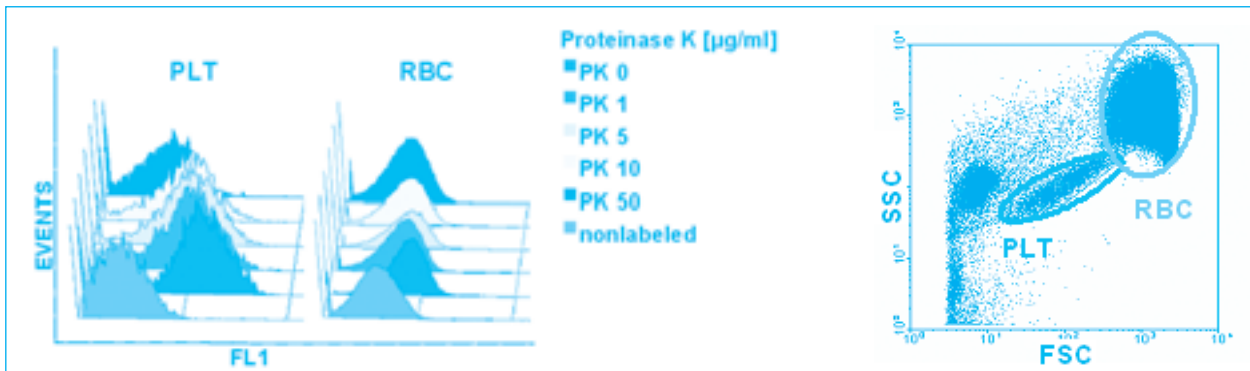


FIG. 2A: PRP^C ON RBC IS SENSITIVE TO PROTEOLYSIS BY PROTEINASE K MEASURED BY FLOW CYTOMETRY

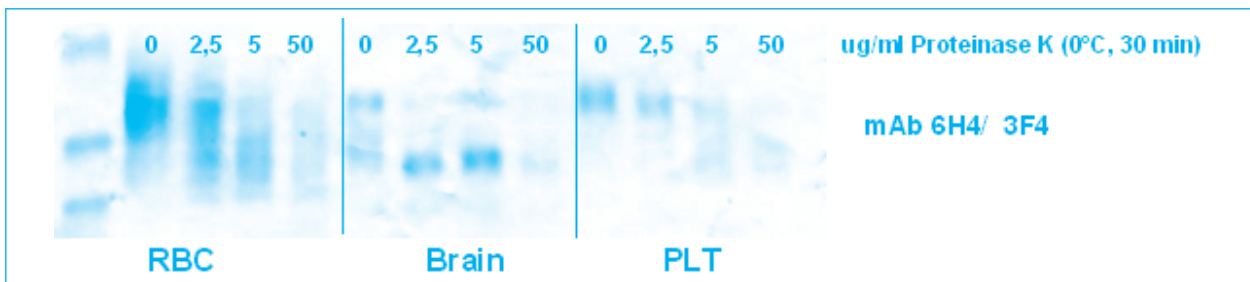


FIG. 2B: PRP^C ON RBC IS NOT LESS SENSITIVE TO PROTEINASE K TREATMENT THAN PRP^C ON PLT OR BRAIN UNDER MILD CONDITION

The lower binding of 3F4 antibody to RBC PrP^C could be due to the N-terminal truncation of PrP^C. PrP^C from Western blot of RBC ghosts (isolated membranes) detected with MAbs 6H4 and AG4 (PrP³¹⁻⁵¹) shows that it seems that PrP^C is mainly in di-glycosylated form, detected as a diffuse band with molecular weight slightly higher (35–38 kDa) than brain PrP^C. This difference diminished after deglycosylation of sample with PNGase F. We did not observe any relevant band with lower molecular weight suggesting that RBC PrP^C is not truncated (FIG. 3).

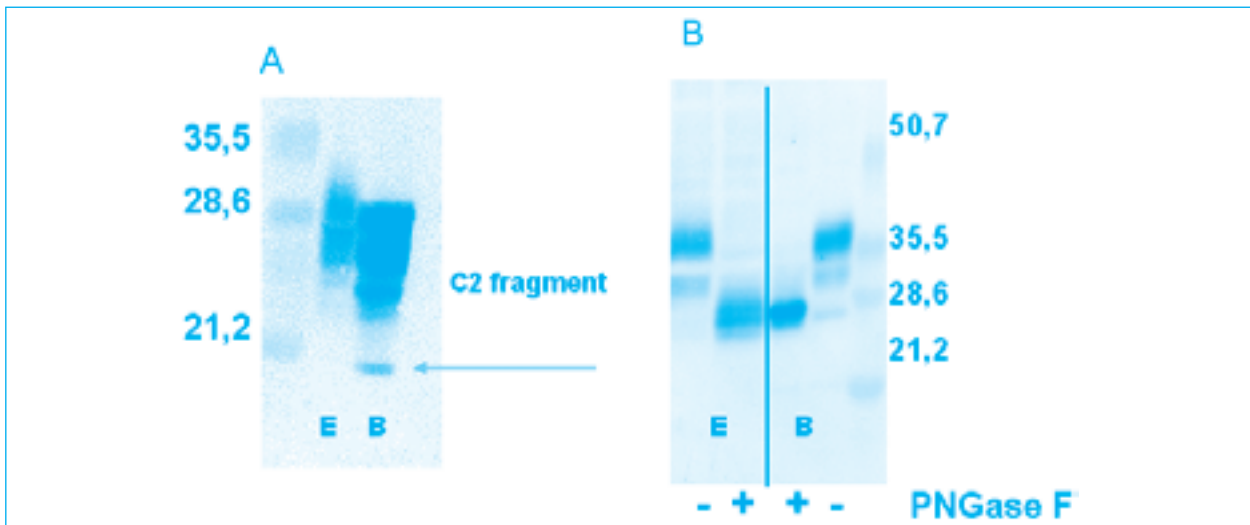


FIG. 3: COMPARISON OF RBC AND BRAIN PRP^C MOLECULAR WEIGHT SHOWS THAT PRP^C ON RBC IS NOT TRUNCATED AT N-TERMINUS. E – RBC, B – Brain, A) Comparison of molecular weights of PrP^C, detected by mAb 6H4. B) Molecular weight of PrP^C after deglycosylation by PNGase F.

If conformation prevents binding of 3F4 then we could abrogate it by denaturation. The result of denaturation by boiling in SDS shows that 3F4 did not detect PrP^C in RBC but it detected brain PrP^C. In comparison 6H4 detected PrP^C with similar sensitivity to RBC and brain (FIG. 4).

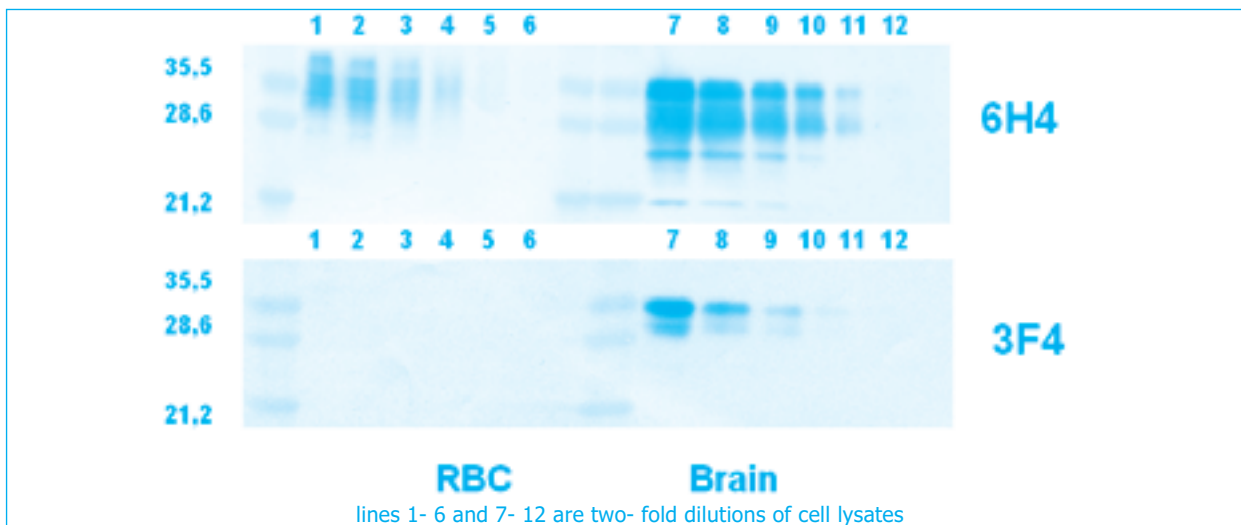


FIG. 4: PRP^c IS NOT RECOGNIZED BY MAB 3F4 EVEN AFTER PROTEIN DENATURATION WITH SDS

PrP^c is glycosylated protein and oligosaccharides may mask epitope for 3F4. But even after deglycosylation, 3F4 did not bind to PrP^c on RBC (FIG. 5).

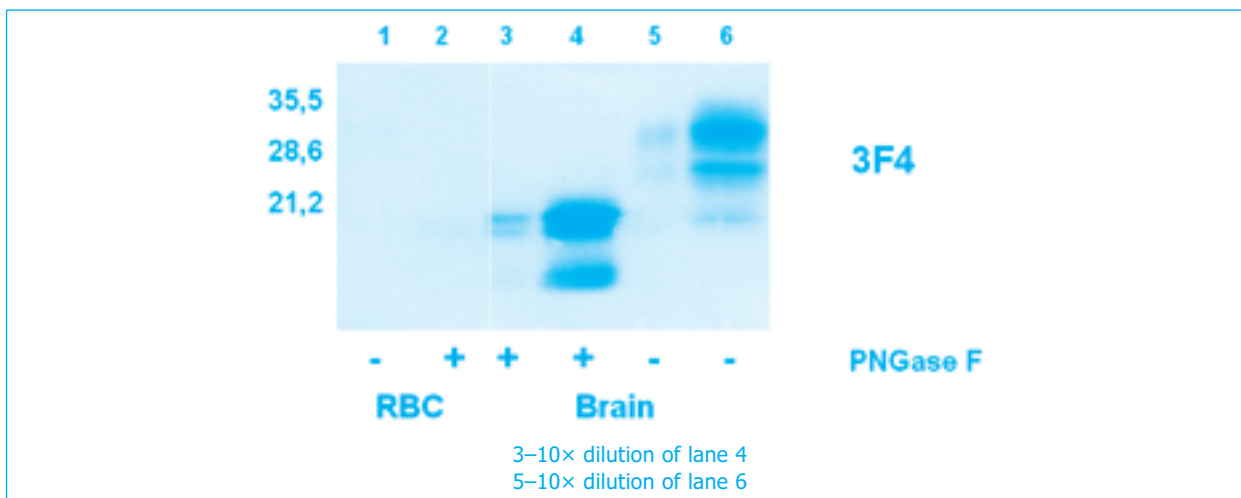


FIG. 5 : MKHM EPIPOPE FOR 3F4 IS NOT MASKED BY GLYCOSYLATION.

Remaining explanation of weak 3F4 reactivity is that its epitope MKHM on RBC PrP^c is modified. One of the possibilities is that it could be modified by Advanced Glycation Endproducts (AGE). AGE is class of heterogenous complex products which is a result of reaction between sugars and free amino groups of proteins. They are formed in aging, diabetes mellitus or renal failure (Singh et al., 2001, Wautier and Guillausseau, 2001). Interestingly, 3F4 epitope -MKHM contains free amino group at Lysine residue. RBC are living sufficiently long (3 months), enough time to be modified. Moreover, recently, modification of Lys residues of brain PrP^{Sc} by AGE has been reported (Choi et al., 2004). Analogical situation may be seen *in vitro* after experimental modification of Lys residues in brain PrP^c. After treatment with increasing concentrations of NHS- biotin we observed that Lys modification led to loss of 3F4 binding (FIG. 6). For modification by AGE speaks also difference between situation in peripheral blood and cord blood. PrP^c on erythroid CD71+ cells in cord blood was detected equally well with 3F4 and 6H4 (FIG. 7), suggesting that modification of PrP^c occurs after release of RBC into periphery.

Finally we conclude that human RBC belong to cells with low expression of PrPc ~ 300 molecules of PrPc/cell but because of the high number of RBC in blood it makes (~50%) of blood cell associated PrP^c. Methods which utilize MAbs FH11 and 3F4 may underestimate quantity of PrP^c in RBC and therefore underestimate risk of possible involvement in propagation of PrP^{Sc}. Since the PrP^{Sc} arises from PrP^c by conformational change induced by PrP^{Sc} (by endogenously mutated PrP^c or by externally introduced PrP^{Sc}) then it could possess the same modifications. If similar modification would be present in blood PrP^{Sc} then screening tests for its presence in blood utilizing MAb 3F4 may have problems with its detection.

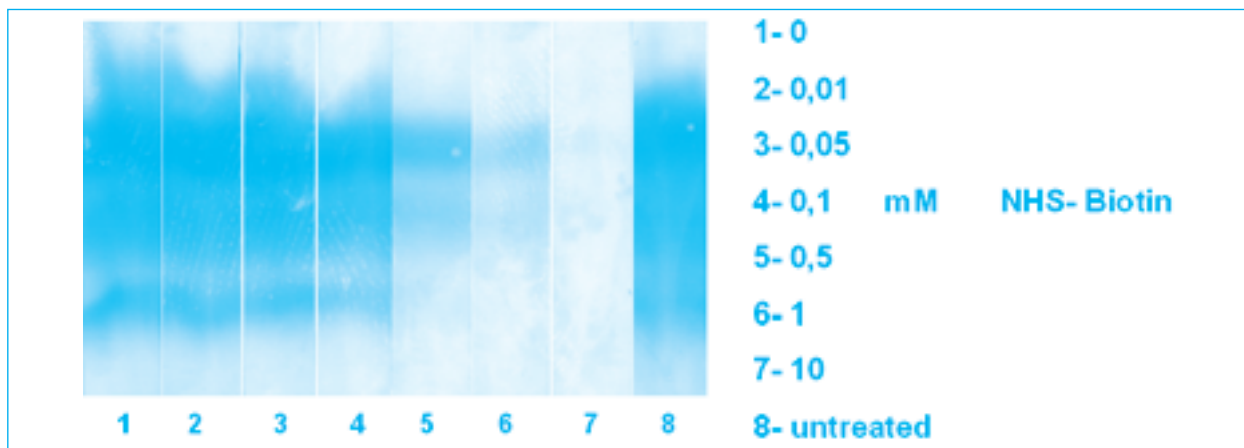


FIG. 6 : *IN VITRO* MODIFICATION OF LYSINE RESIDUES IN BRAIN PRP^c SEQUENCE PREVENTS BINDING OF 3F4.

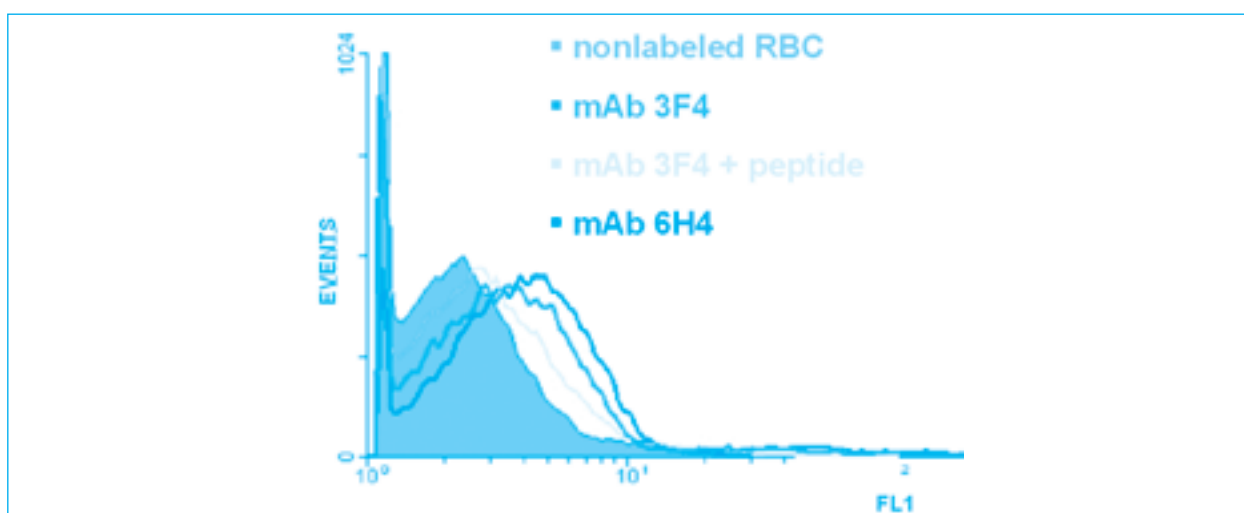


FIG. 7 : EQUAL DETECTION OF PRP^c ON CD71+ ERYTHROID CELLS IN CORD BLOOD BY MABS 3F4 AND 6H4.

REFERENCES

1. Barclay et al., Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry, (1999). *Br J Haematol* 107(4): 804–14.
2. MacGregor et al., Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components, (1999). *Vox Sang* 77(2): 88–96.
3. Holada, K. and J. G. Vostal, Different levels of prion protein (PrP^c) expression on hamster, mouse and human blood cells, (2000). *Br J Haematol* 110(2): 472–80.
4. Singh et al., Advanced Glycation End Products: a review, (2001). *Diabetologia* 44: 129–146.
5. Wautier J. L. and Guillausseau, Advanced Glycation End Products, Their Receptors and Diabetic Angiopathy, (2001). *Diabetes Metab* 27: 535–542.
6. Choi et al., Nonenzymatic Glycation at the N Terminus of Pathogenic Prion Protein in Transmissible Spongiform Encephalopathies, (2004). *JBC* 279(29) 30402–30409.

2. MÍSTO

VLIV SONIC HEDGEHOG NA VÝVOJ AORTÁLNÍCH
OBLOUKŮ

Autor: Mgr. Hana Kolesová, Anatomický ústav 1. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Praze, hana.kolesova@lf1.cuni.cz

Školitel: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.



Hana Kolesová

ÚVOD

Sonic hedgehog (Shh)

Protein Sonic hedgehog (Shh) je významným morfogénem, mitogénem (např. Duprez et al. 1998) a faktorem přežívání buněk za embryonálního vývoje obratlovců (např. Watanabe et al. 1998). Podílí se opakovaně na různých místech a v různých stádiích na formování řady struktur a poskytuje buňkám polohovou informaci. U obratlovců jsou známy tři proteiny rodiny hedgehog: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) a Desert hedgehog (Dhh), kde Shh má nejširší spektrum účinků. Všechny tři proteiny byly pravděpodobně v evoluci obratlovců vytvořeny duplikací genu *hedgehog* (hh), který je znám u drosofil jako jeden z genů kontrolujících vývoj. Od drosofil pochází i název. Mutace v tomto genu má za následek ztrátu segmentálního uspořádání trnovitých výběžků kutikuly a embrya jsou pokryta výběžky v celém rozsahu a vypadají jako ježek.

Shh hraje významnou roli ve vývoji obratlovců již od raných stádií embryogeneze, kdy jeho exprese je prvním výrazem pravolevé asymetrie (Levin et al., 1995). V pozdějších stádiích Shh ovlivňuje např. vývoj končetiny určením její antero-posteriorní osy (Riddle et al. 1993), řídí vývoj a diferenciaci motoneuronů nervové trubice (Ericson et al., 1996), je důležitý při určení antero-posteriorní osy střeva a oddělení respiračního traktu od trávicí trubice (Roberts et al., 1995), apod. Jeho absence se projevuje značnými malformacemi (cyclopií, defekty ve vývoji nervového systému, atd.; např. Hu and Helms (1999).

V současné době se zkoumá vliv Shh produkovaného entodermem embryonálního střeva na vývoj cévního systému. Podle jedné z hypotéz je Shh nutný k indukci prekurzorů endothelových a krevních buněk (hemangioblastů) v extraembryonálních krevních ostrůvcích (Wilting and Christ, 1995). Novější studie ale ukazují, že Shh není nutný k indukci prekurzorů krevních buněk, ale je nezbytný pro utváření luminizovaných endothelových trubic, které jsou základem krevních cév (Vokes and Krieg, 2002). V nedávné době bylo zjištěno, že se Shh podílí na vývoji žaberních oblouků, které obklopují přední část trávicí trubice (Yamagishi et al., 2006). Součástí žaberních oblouků jsou i velké cévní kmeny – aortální oblouky. Význam Shh pro jejich tvorbu není dosud objasněn.

Aortální oblouky

Aortální oblouky jsou cévní kmeny, které společně s dorsální a ventrální aortou tvoří první velké cévy embrya obratlovců. Jejich endothelové buňky se diferencují z angioblastů, které jsou determinovány již před gastrulací (Kirschhofer et al., 1994). V raných embryonálních stádiích jsou přes ventrální aortu napojeny na srdce a krev je z nich odváděna dorzální aortou do celého těla.

V embryogenezi se postupně zakládá šest párů aortálních oblouků, které svým vývojem do jisté míry rekapituluji evoluční vývoj. U ryb a larev obojživelníků obstarávají aortální oblouky přítok krve do žaber. U plazů, ptáků a savců došlo ke změně jejich původní funkce a s postupujícím vývojem se stávají součástí velkých tepen hlavy a krku.

První dva páry aortálních oblouků jsou vytvořeny jen krátce v raném období a stávají se koncovými větvemi cév vznikajících z třetího páru aortálních oblouků. Ze třetího páru aortálních oblouků se vyvíjejí cévy hlavy a krku (*arteria carotis externa et interna*). Čtvrtý pár aortálních oblouků je hlavním kmenem, který vede okysličenou krev do těla. Levý oblouk se u ptáků redukuje (vzniká z něho část cév pro pravou přední končetinu) a zachovává se jen pravý oblouk. U savců vzniká aorta z levého oblouku a z pravého se tvoří *truncus brachiocephalicus* a začátek *a. subclavia dx*. Pátý pár aortálních oblouků zaniká v rané embryogenezi. Z šestého páru aortálních oblouků pocházejí cévy, které vedou krev do plic (*truncus pulmonalis, aa. pulmonales*) a *ductus arteriosus*.

Aortální oblouky jsou obsaženy v žaberních obloucích, které obklopují hlavovou část trávicí trubice, a proto lze předpokládat přímý vliv Shh produkovaného entodermem embryonálního faryngu na jejich utváření. Protože se aortální oblouky zakládají v rané embryogenezi jsou vhodným objektem ke studiu vlivu Shh na vývoj cévního systému.

Cílem práce je proto studovat vliv proteinu Shh na embryonální vývoj žaberních a aortálních oblouků a tím přispět k objasnění významu Shh pro vývoj této krajiny a jejích cév. Jako modelový organismus byla vybrána embrya japonské křepelky, u kterých lze protilátkou QH1 selektivně značit hemangiogenní buňky a z nich se diferencující endothelové buňky a krevní buňky kromě červených krvinek (Pardanaud et al. 1987).

MATERIÁL A METODY

Oplozená vejce japonské křepelky (*Coturnix coturnix japonica*) z chovu Ústavu zemědělské výroby v Praze-Uhřetěvesi byla inkubována při 38 °C a ke studiu byla použita embrya ve stádiích 6–26 HH (Hamburger and Hamilton, 1951), což odpovídá 23–110 hodinám inkubace. Ke studiu inhibice Shh cyclopaminem bylo použito 50 embryí a k inhibici Shh protilátkou 70 embryí.

Znázornění Shh na úrovni mRNA

mRNA *pro Shh* byla znázorňována pomocí *in situ* hybridizace v celých embryích (postup dle Nieto et al., 1996) s digoxigeninem značenou RNA antisense sondou. Na přípravu RNA sond byl použit plazmid pcvhh1 s inzertem cDNA pro Shh získaný od J. Dodd (Dale et al., 1999). Embrya byla fixována 4% roztokem PFA v PBT, dehydratována methanolem a vybělena směsí methanol/peroxid. Odběr embryí a celý další postup byl prováděn za podmínek zabraňujících kontaminaci RNAasou. Po rehydrataci byla embrya permeabilizována proteinázou K, vyprána a dofixována glutaraldehydem. Přes noc pak probíhala prehybridizace v hybridizační směsi při teplotě 70 °C. Druhý den byla přidána k prehybridizačnímu roztoku vlastní sonda ve finální koncentraci 50 ng/ml. Hybridizace byla prováděna 48 hodin při teplotě 65 °C. Následovalo posthybridizační praní v roztocích SSC a CHAPS. Inkubace s primární protilátkou (1:4000) proti digoxigeninu značenou alkalickou fosfatázou probíhala přes noc při 4 °C. Následovalo praní (cca 36 hodin) v KTBT a reakce se substráty alkalické fosfatázy (NBT a BCIP) do požadované intenzity zbarvení a nakonec fixace ve 4% PFA.

Znázornění Shh na úrovni proteinu

Protein Shh byl detekován v kryostatových řezech pomocí monoklonální protilátky 5E1 (Hybridoma Bank) v ředění 1:500. Jako sekundární protilátka byla použita Goat anti Mouse Biotin (Sigma B7264) v ředění 1:150. Terciální protilátkou byla Extravidin Px (Sigma 2886) v ředění 1:100. Jako chromogen byl použit DAB (Sigma D5905).

Znázornění krevních cév

Endothel krevních cév jsme značili pomocí monoklonální protilátky QH1 (Hybridoma Bank) v parafinových řezech v ředění 1:1000. Jako sekundární protilátka byla použita Goat anti Mouse Px IgG (Sigma A 4416) a jako chromogen byl použit DAB (Sigma D5905).

Jako další metoda znázornění cévního systému byl použit nástřík tuší přes vitelinní žíly skleněnou mikrokapilárou. K nástříku jsme použili netoxickou tuš (Pelican) v ředění 1:10 v PBS.

Inhibice signální kaskády Shh cyclopaminem.

Cyclopamin (Sigma) je rostlinný alkaloid z *Veratrum album*, který specificky inhibuje funkci Shh (Incardona et al., 1998) na úrovni jeho signální kaskády. Cyclopamin jsme aplikovali v dávce 5ng v 5ěl cyclodextrinu, který napomáhá pozvolnému a plynulému uvolňování cyclopaminu do okolí. Roztok byl aplikován pod vitelinní membránu do branchiální oblasti embryí ve stádiu 10–18 HH a po 1–3 dnech reinkubace byla embrya odebírána, fixována a zpracována pro hodnocení v histologických řezech.

Inhibice Shh proteinu protilátkou 5E1

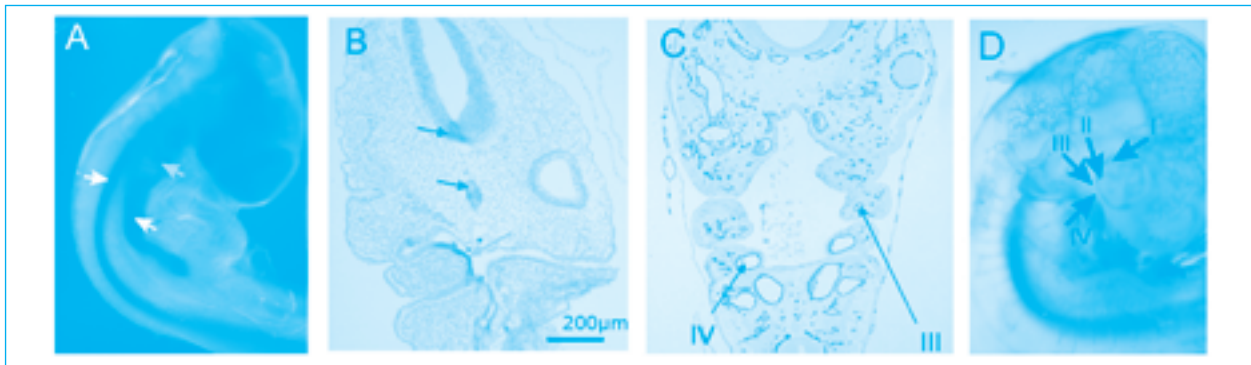
Dostatek protilátky 5E1 k inhibici Shh v embryu *in vivo* jsme dosáhli aplikací 15–30 miliónů hybridomových buněk produkujících tuto protilátku. Tyto buňky jsme injekovali pod vitelinní membránu na povrch branchiální krajiny embryí ve stádiu 10–18 HH. Buňky hybridomové linie 5E1 (Roelink et al. 1995) jsme kultivovali v médiu DMEM obohaceném 10% fetálním hovězím sérem a těsně před aplikací jsme je centrifugovali a resuspendovali v malém objemu PBS. Po 1–3 dnech reinkubace jsme embrya odebrali a zpracovali pro hodnocení efektu inhibice.

VÝSLEDKY

Vývoj exprese Shh

Expresi mRNA pro Shh jsme sledovali ve stádiích 10–26 HH pomocí hybridizace *in situ* v celých embryích s anti-sense sondou značenou digoxigeninem. Hybridizační signál byl u embrya ve stádiu 6 HH znatelný jen difúzně v hlavové oblasti. Od stádia 11 HH byla mRNA exprimována v notochordu a spodinové ploténce nervové trubice. Od stádia 13 HH byla mRNA pro Shh zjištěna také v přední části trávicí trubice, tedy i v oblasti žaberních oblouků (obr. 1A). Dále byl signál od stádia 17 HH patrný v kloace a od stádia 18 HH v zóně polarizační aktivity končetinového pupenu horní i dolní končetiny. Přesnou lokalizaci výskytu mRNA jsme ověřovali na řezech.

Ve stejných stádiích vývoje jsme v oblasti žaberních oblouků sledovali také expresi proteinu Shh. Znázorňovali jsme ho pomocí monoklonální protilátky 5E1 v kryostatových řezech. Jeho výskyt jsme zachytili od stádia 12 HH, kdy je produkován v notochordu a ve spodinové ploténce nervové trubice. Od stádia 18 HH lze protein Shh prokázat také v entodermu předního střeva v oblasti žaberních oblouků. V těchto třech lokalizacích je jeho produkce patrná i v dalších sledovaných stádiích vývoje (obr. 1B). Tato zjištění odpovídají údajům o jeho výskytu u embryí kuřat bílé leghornky (např. Roelink et al. 1995).



OBR. 1: EXPRESE MRNA PRO SHH A EXPRESE PROTEINU SHH; ZNÁZORNĚNÍ AORTÁLNÍCH OBLOUKŮ U NORMÁLNÍCH EMBRYÍ.

A – Expres mRNA pro Shh znázorněná hybridizací *in situ*. Shh je exprimován ve spodinové ploténce nervové trubice a v chordě (bílá šipka), v přední části trávicí trubice (žlutá šipka) a tedy i v entodermu žaberních oblouků (oranžová šipka).

B – Expres proteinu Shh znázorněná pomocí protilátky 5E1. Pozitivita reakce je patrná ve spodinové ploténce nervové trubice, v chordě (černé šipky) a v entodermu žaberních oblouků (oranžová šipka)

C – znázornění aortálních oblouků u normálního embrya ve stádiu 18 HH pomocí protilátky QH1. Šipky ukazují III. a IV. aortální oblouk.

D – znázornění aortálních oblouků u normálního embrya ve stádiu 18 HH pomocí nástřiku tuší; I–IV – první až čtvrtý aortální oblouk.

Cellkově lze shrnout, že exprese mRNA pro Shh je prokazatelná o jedno až tři vývojová stádia dříve než protein Shh. Lokalizace mRNA pro Shh a proteinu u křepelky se shoduje s lokalizací u kuřecích embryí (Roelink et al. 1995).

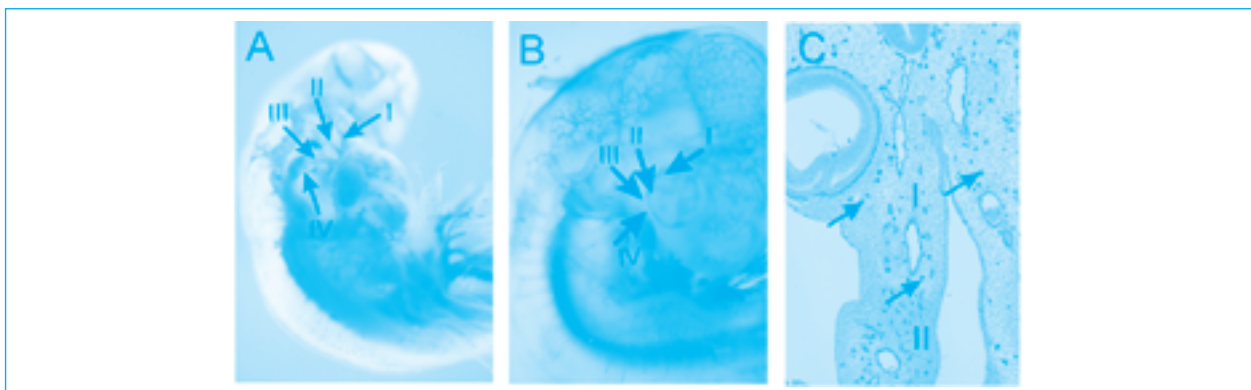
Vývoj aortálních oblouků

Znázorněním endothelu aortálních oblouků pomocí protilátky QH1 a nástřikem tuší jsme sledovali časový průběh vývoje aortálních oblouků u embryí japonské křepelky.

Od stádia 12 HH vytvořen první aortální oblouk. Ve stádiu 15 HH se k němu přidává druhý aortální oblouk a od stádia 18 HH třetí a čtvrtý. Ve stádiu 21 HH se vytváří pátý aortální oblouk a ve stádiu 23 HH vzniká šestý oblouk (obr. 1C, D). Získali jsme tak údaje o postupu morfogeneze aortálních oblouků potřebné pro porovnání s jejich vývojem po inhibici Shh. Jako další podklad pro toto hodnocení sloužily údaje o vývoji aortálních oblouků u kuřecích embryí (Hiruma a Hirakow 1995).

Inhibice funkce Shh cyclopaminem

Aplikace cyclopaminu vedla k rozdílným nálezům. Přibližně třetina embryí nepřeživala aplikaci 5ng cyclopaminu a na dalších embryích nebyl patrný žádný defekt a jen zhruba třetina vykazovala zřetelné malformace. Tento heterogenní nález zřejmě souvisí s tím, že cyclopamin se jako lipofilní látka váže na žloutek a jeho vazba na embryo proto může velmi kolísat (Roelink, osobní sdělení). K hodnocení efektu inhibice jsme proto použili pouze malformovaná embrya (6 embryí zpracovaných v histologických řezech a 8 embryí po nástřiku tuší). Tato embrya vykazovala malformace hlavy (redukce telencefalických váčků, tendence k cyclopii). Aortální oblouky byly vytvořeny, ale byly dilatované a měly nepravidelný průběh (obr. 2 A, B). V řezech bylo patrné jejich nepravidelné lumen a zvýšená frekvence QH1 pozitivních buněk, které



OBR. 2: ŽABERNÍ OBLOUKY PO INHIBICI CYCLOPAMINEM

A – aortální oblouky u embrya po inhibici Shh cyclopaminem. Hlavová oblast embrya je malformovaná, aortální oblouky mají nepravidelný průběh, III. a IV. aortální oblouk jsou propojeny spojkami; I–IV – první až čtvrtý aortální oblouk; nástřik tuší.

B – aortální oblouky u normálního embrya; I–IV – první až čtvrtý aortální oblouk; nástřik tuší.

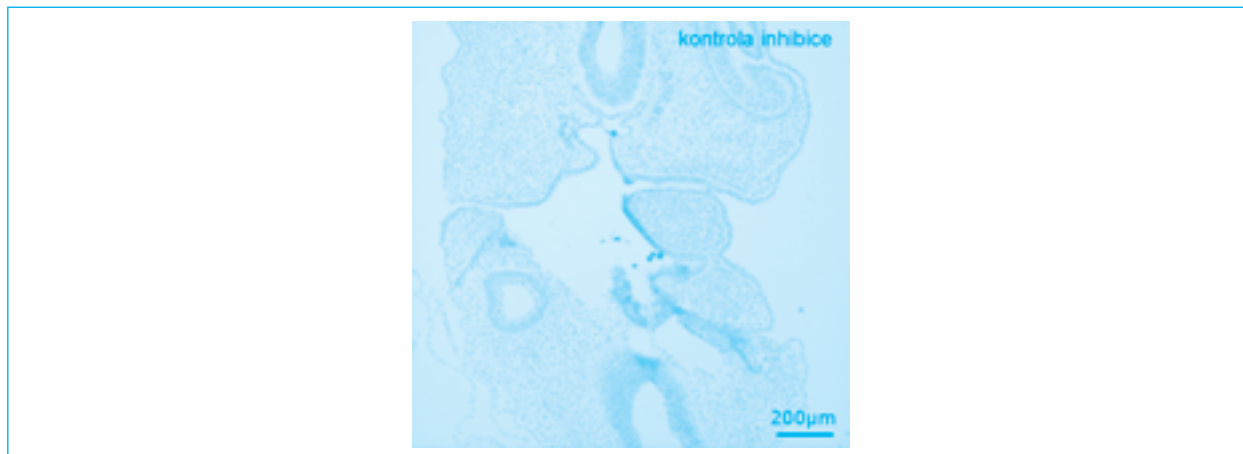
C – Detail 1. a 2. žaberního oblouku s příslušnými aortálními oblouky (I, II) znázorněnými protilátkou QH1. Šipky – QH1-pozitivní fagocytující buňky v mezenchymu žaberních oblouků.

nebyly zavzaty do cévní stěny. Některé z těchto buněk byly velké fagocytující buňky s fagosomy (obr. 2C) Ve srovnání s efektem inhibice Shh pomocí 5E1 protilátky by nález fagocytujících buněk méně výrazný.

Inhibice proteinu Shh protilátkou 5E1 produkovanou hybridomovými buňkami

Kontrola inhibice

Pomocí sekundární protilátky, která se váže na anti-Shh protilátku (5E1), jsme v kryostatových řezech z embryí, ke kterým byly aplikovány hybridomové buňky, ověřovali difúzi 5E1 protilátky do embrya. Zjistili jsme, že sekundární protilátka se navázala na místa produkce Shh. Reakce byla patrná v notochordu, spodinové ploténce nervové trubice a v entodermu předního střeva. V těchto lokalizacích je tedy funkce proteinu Shh inhibována.



OBR. 3: ŘEZ BRANCHIÁLNÍ KRAJINOU EMBRYA (21 HH) 24 HODIN PO APLIKACI HYBRIDOMOVÝCH BUNĚK PRODUKUJÍCÍCH ANTI-SHH PROTILÁTKU.

Inkubace se sekundární protilátkou označila místa produkce a tedy i inhibice Shh v entodermu žaberních oblouků, v chordě a spodinové ploténce neurální trubice. V dutině faryngu jsou patrné hybridomové buňky.

Efekt inhibice Shh protilátkou 5E1

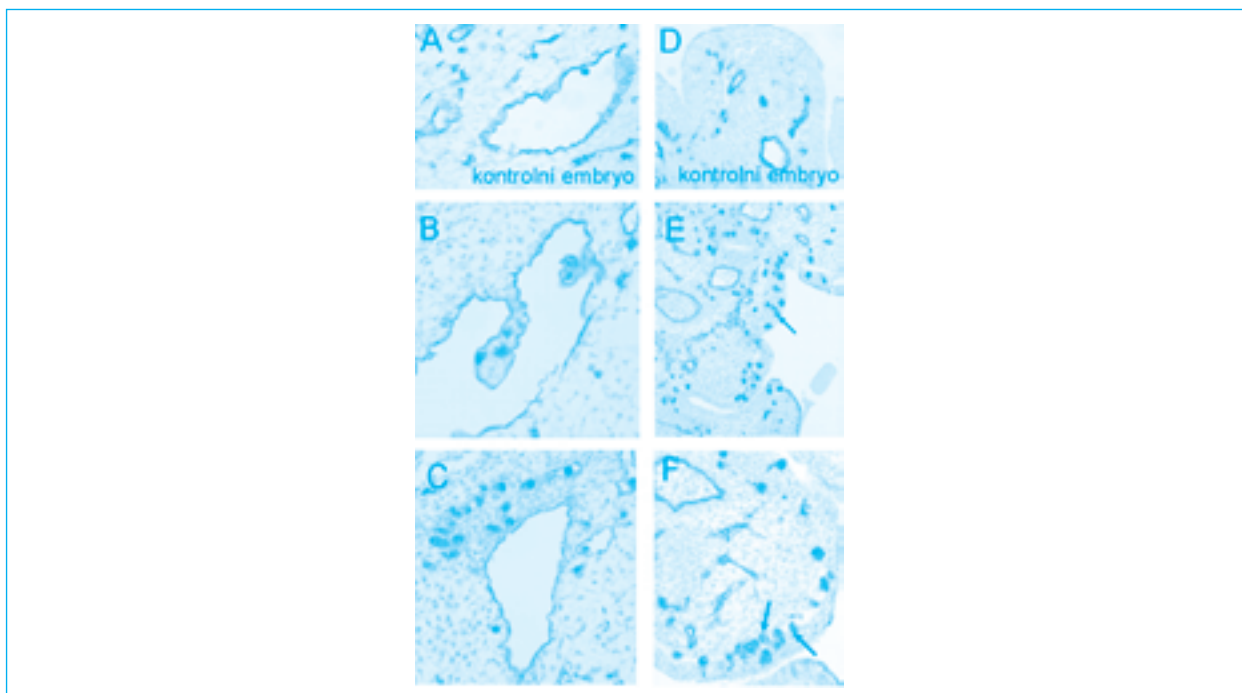
Embrya, k nimž byly aplikovány buňky produkující anti-Shh protilátku, nebyla na rozdíl od inhibice Shh cyclopaminem malformována. Aortální oblouky byly vytvořeny a jejich lumen bylo dilatované a nepravidelné. Ve výchlipkách cévní stěny byly nakupeny QH1 pozitivní buňky ve výrazně větším množství, než po podání cyclopaminu. Dále byly tyto QH1 pozitivní buňky obsaženy v mezenchymu v celém rozsahu žaberních oblouků, okolo dorzální aorty a v ektodermu žaberních oblouků. Největší z nich měřily na průřezu až 20 μ m. Vzhledem ke spektru buněk, které značí protilátka QH1, lze tyto buňky považovat za prekurzory endothelových buněk, za hemangiogenní buňky a za fagocytující buňky podobným makrofágům. Většina těchto buněk obsahovala fagosomy a jde tedy o fagocytující buňky. V chimérách kuřete a křepelky byl tento typ buněk identifikován jako buňky, které v časných stádiích vývoje plní funkce makrofágů. Pocházejí z extraembryonálních krevních ostrůvků a jsou označovány jako macrophage-like buňky (Cuadros et al. 1992), na rozdíl od makrofágů, které se diferencují intraembryonálně až v pozdějších stádiích vývoje.

DISKUZE A ZÁVĚRY

Z našich nálezů tedy vyplývá, že inhibice Shh má za následek rozsáhlý výskyt apoptózy a následné fagocytózy apoptotických tělísek. Vystupňovanou apoptózu je možné považovat za následek inhibovaného anti-apoptického působení Shh proteinu. U myši s vyřazeným genem pro Shh pozoroval Yamagishi et al. (2006) zvýšený výskyt apoptózy v mezenchymu prvního žaberního oblouku ve srovnání s kontrolními embryi. Překvapivě však nebyl zvýšený výskyt apoptózy u těchto myších embryí zjištěn ve druhém a třetím žaberním oblouku. V našem pozorování byla zvýšená frekvence apoptózy (stanovená na základě zvýšeného výskytu fagocytujících buněk) zjištěna v celém rozsahu žaberní krajiny.

V tomto stádiu našeho studia nemůžeme zatím rozhodnout, zda apoptóze podléhají pouze mezenchymové buňky nebo také endothelové buňky a jejich prekurzory. Vzhledem k tomu, že fagocytovaná apoptotická tělíska vykazují QH1 pozitivitu, je pravděpodobné, že apoptóze podléhají i endothelové buňky a jejich prekurzory. Svědčí pro to také infiltrace výchlipkek endothelové stěny cév fagocytujícími buňkami.

Naše další pozorování se musí proto zaměřit na detekci apoptózy pomocí jejích časných markerů (např. aktivované kaspázy 3) a na studium vlivu deletrující inhibice Shh a následných změn v morfogeneze branchiální krajiny. Dosavadní výsledky ukazují, že krátkodobá inhibice Shh produkovaného entodermem embryonálního faryngu vede u embryí japonské křepelky k narušení angiogeneze aortálních oblouků a k narušení vývoje žaberních oblouků.



OBR. 4: ŽABERNÍ OBLOUKY PO INHIBICI ANTI-SHH PROTILÁTKOU.

A–F – řezy žaberními oblouky embryí ve stádiu 18 HH (A, B, C) a ve stádiu 21 HH (D, E, F). B, C, E, F – inhibice Shh protilátkou 5E1 produkovanou hybridomovými buňkami, reinkubace jeden den; A, D – kontrolní embrya; reakce s protilátkou QH1; B, C, E, F – dobarveno hematoxylinem.

A, D – aortální oblouky kontrolních embryí; minimální výskyt QH1-pozitivních buněk v mezenchymu.

B – nepravidelné lumen aortálního oblouku s výchlípkou stěny. Výchlípka je infiltrována QH1 pozitivními buňkami.

C – zmnožení QH1 pozitivních macrophage-like buněk v mezenchymu okolo aortálního oblouku.

E – zvýšený výskyt velkých fagocytujících macrophage-like buněk v mezenchymu a v ektodermu žaberních oblouků (šipky). Malé QH1-pozitivní buňky v mezenchymu je možné považovat za angiogenní buňky, které dosud nejsou součástí cévní stěny.

F – velké fagocytující buňky v mezenchymu pod ektodermem žaberního oblouku i v ektodermu.

Závěr

Shh produkovaný entodermovými buňkami embryonálního faryngu se uplatňuje při formování endothelových trubic aortálních oblouků. Dále je Shh nutný pro přežívání buněk v oblasti žaberních oblouků, neboť jeho krátkodobá inhibice vede ke zvýšenému výskytu apoptózy a fagocytujících buněk.

LITERATURA

1. Cuadros M A, Coltey P, Nieto M C, Martin C, 1992. Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. *Development* 115(1):157-168.
2. Dale K, Sattar N, Heemskerck J, Clarke J D W, Placzek M, Dodd J, 1999. Differential patterning of ventral midline cells by axial mesoderm is regulated by BMP7 and chordin. *Development* 126 (2):397-408.
3. Duprez D, Fournier-Thibault C, Le Douarin N, 1998. Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development* 125(3):495-505.
4. Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, and Jessell T M. Two Critical Periods of Sonic Hedgehog Signaling Required for the Specification of Motor Neuron Identity. *Cell* 87 (1996) 661-673.
5. Hamburger V, Hamilton HL, 1951. A series of normal stages in development of the chick embryo. *J Morphol* 88: 49-92
6. Hiruma T, Hiraokow R, 1995. Formation of the pharyngeal arch arteries in the chick embryo. Observations of corrosion casts by scanning electron microscopy. *Anatomy and Embryology* 191(5):415-423.
7. Hu D, Helms J A, 1999. The role of Sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development* 126(21):4873-4884.
8. Incardona J P, Gaffield W, Kapur R P, Roelink H, 1998. The teratogenic veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125(18):3553-3562
9. Kirschhofer K von, Grim M, Christ B, Wachtler F, 1994. Emergence of myogenic and endothelial cell lineages in avian embryos. *Devel. Biol.* 163: 270 - 278
10. Levin M, Johnson, R L, Stern C D, Kuehn M, Tabin C, 1995. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82:803-814

11. Nieto MA, Patel K, Wilkinson DG, 1996. *In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mounts and in tissue sections. Methods Cell Biol 40: 219-235*
12. Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, 1987. *Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. Development 100 (2):339-349.*
13. Riddle R, Johnson R, Laufer E, Tabin C, 1993. *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of ZPA. Cell 75:1401-1416*
14. Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessell TM. 1995. *Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. Cell 5;81(3):445-55.*
15. Roberts D J, Johnson R L, Burke A C, Nelson C E, Morgan B A, Tabin C, 1995. *Sonic hedgehog is an entodermal signal inducing BMP-4 and Hox genes during induction and reorganization of the chick hindgut. Development 121:3163-3174*
16. Vokes S A, Krieg P A, 2002. *Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification. Development 129:775-785*
17. Watanabe Y, Duprez D, Monsoro-Burq A-H, Vincent C, Le Douarin N M, 1998. *Two domains in vertebral development: Antagonistic regulation by SHH and BMP4 proteins. Development 125(14):2631-2639.*
18. Wilting J, Christ B, 1995. *Embryonic angiogenesis. Naturwissenschaften 83:153-164*
19. Yamagishi C, Yamagishi H, Maeda J, Tsuchihashi T, Ivey K, Hu T, Srivastava D, 2006. *Sonic hedgehog is essential for first pharyngeal arch development. Pediatric research. 59(3):349-354*

3. MÍSTO

**VÝZNAM ENDOKRINNÍ FUNKCE TUKOVÉ TKÁNĚ
U KRITICKY NEMOCNÝCH PŘI VZNIKU INZULÍNOVÉ
REZISTENCE**

Jaromír Křemen

Autor: Křemen J., Dolinková M., Anderlová K, Lacinová Z., Krajíčková J., Bláha J.*, Haluzíková D., Svačina S., Haluzík M.

Školitel: doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc.

III. interní klinika 1. LF UK a VFN

*Klinika anestézie, resuscitace a intenzivní medicíny, 1. LF UK a VFN, Praha

ÚVOD

U kriticky nemocných pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče se velmi často vyskytuje hyperglykémie, která bývá též označována jako „diabetes z poškození“. Za její vznik jsou zodpovědné částečně odlišné mechanismy než u diabetes mellitus 1. a 2. typu a vyskytuje se jak u diabetiků, tak u pacientů bez předchozí anamnézy diabetu. Jednou z hlavních příčin hyperglykémie u kriticky nemocných je uvolnění kontraregulačních stresových hormonů (katecholaminy, kortisol, glukagon, růstový hormon) a následná snížená citlivost k účinkům inzulínu, která je způsobena poruchou postreceptorových intracelulárních signalizačních mechanismů inzulínového receptoru. Velký vliv na vznik hyperglykémie má také uvolnění prozánětlivých cytokinů (např. TNF- α , IL-1, IL-6), které současně potencují produkci stresových hormonů. Hyperglykémie má u kriticky nemocných pacientů řadu nežádoucích účinků, působí toxicky a zvyšuje oxidační stres.

Nedávná rozsáhlá randomizovaná studie Greet Van den Berghe prokázala, že intenzifikovaná inzulínová terapie (cílová glykémie 4,4–6,1 mmol/l) významně snižuje mortalitu (až o 42 %) i následnou morbiditu u kriticky nemocných pacientů oproti standardní terapii, kdy byl inzulín nasazen až při glykémii vyšší než 12 mmol/l a cílové rozmezí bylo 10–11,1 mmol/l. Bylo prokázáno snížení výskytu nozokomiálních infekcí, orgánových selhání, polyneuropatie kriticky nemocných, zpomalení rozvoje svalové slabosti. Přesné mechanismy účinku intenzifikované inzulínové terapie však nejsou zatím zcela objasněny.

Tuková tkáň je významným producentem řady endokrinních působků, které mají vliv na vznik inzulínové rezistence.

Leptin je významným regulátorem energetické homeostázy, jeho sérové koncentrace pozitivně korelují s celkovým obsahem tuku v organismu. Ob/ob myši s mutací leptinového genu se vyznačují hyperfágií, morbidní obezitou, inzulínovou resistencí a diabetem. Pokles koncentrací leptinu spouští řadu neuroendokrinních a imunitních pochodů, vedoucích k adaptaci na dlouhodobě snížený příjem potravy.

Adiponectin je protein strukturou řazený do rodiny TNF- α , exprese jeho mRNA i sérové koncentrace jsou sníženy u obézních subjektů, jeho sérové koncentrace pozitivně korelují s inzulínovou senzitivitou. Byl prokázán protektivní vliv adiponectinu při rozvoji aterosklerózy, neboť adiponectin brání akumulaci lipidů v makrofázích, vykazuje i účinek protizánětlivý.

Resistin je polypeptidový hormon objevený v r. 2001. Jedná se o hormon s možným etiopatogenetickým významem při vzniku inzulínové rezistence. Jeho sérové koncentrace jsou podle některých prací zvýšeny u pacientů s diabetem mellitem 2. typu, jiné práce tento náleznepotvrdily, výsledky dosavadních studií o vztahu resistinu a inzulínové rezistence jsou tedy dosti rozporuplné.

Interleukin-6 má přímou roli při vzniku inzulínové rezistence narušením signalizační kaskády v hepatocytech, indukuje tvorbu SOCS-3 (supresoru cytokinové signalizace), který inhibuje fosforylaci tyrosinu inzulínového receptoru a další přenos vzruchu.

Expres TNF-alfa je zvýšená u obezity. Jeho zvýšené koncentrace narušují inzulínovou signalizaci, snižuje expresi genu pro adiponectin. Podání anti TNF-alfa protilátek v experimentu zvyšuje inzulínovou senzitivitu.

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) je produkován makrofágy a endoteliálními buňkami cestou aktivace dráhy Nukleárního faktoru - κ B, která je odpovědná za produkci TNF- α . Jeho koncentrace pozitivně korelují s množstvím tukové tkáně a rizikem vzniku aterosklerózy a kardiovaskulárního rizika.

Cílem naší studie bylo posouzení podílu endokrinní dysfunkce tukové tkáně na vznik inzulínové rezistence u kriticky nemocných. Byly hodnoceny změny genové exprese vybraných adipocytokinů (leptin, adiponectin, resistin, interleukin-6, TNF- α) v perioperačním období v podkožní a viscerální (epikardiální) tukové tkáni, a změny sérových koncentrací těchto působků v období pooperačním.

METODIKA

Do studie bylo zařazeno 10 pacientů. Tito pacienti podstoupili elektivní kardiochirurgický výkon (aortokoronární bypass) a byli hospitalizováni na jednotce intenzivní pooperační péče (JIP) Kliniky kardiovaskulární chirurgie 1. LFUK a VFN.

Vzorky viscerální a subkutánní tukové tkáně byly odebírány na začátku a na konci operace. Krevní odběry byly provedeny předoperačně, bezprostředně po operaci po přijetí na JIP a po 6, 12, 24, 48 a 120 hodinách od přijetí na JIP. Všichni pacienti byli léčeni intenzivní inzulínovou terapií k udržení glykémie v rozmezí 4,4–6,1 mmol/l podle protokolu JIP.

Vývoj inzulínové rezistence byl sledován hodnocením změny rychlosti kontinuální inzulínové infuze nutné k udržení euglykémie.

VÝSLEDKY

Během operace nedošlo k signifikantním změnám exprese mRNA pro leptin a adiponectin ani v subkutánní ani ve viscerální tukové tkáni. Došlo však k významnému vzestupu mRNA pro IL-6 v obou typech tukové tkáně. Vzestup mRNA pro resistin a TNF- α byl zaznamenán pouze v subkutánní tukové tkáni. Míra tohoto vzestupu odpovídala míře vzestupu sérových koncentrací uvedených cytokinů.

K maximálnímu (48-násobnému) vzestupu sérových koncentrací IL-6 došlo ve 12. hodině od přijetí na JIP, mírnější (3násobné) vzestupy sérových koncentrací byly zaznamenány u TNF- α a leptinu. Sérové koncentrace resistinu stouply 2,7násobně v 6. hodině a zůstaly až do 48. hodiny. Naproti tomu došlo k pooperačnímu poklesu koncentrací adiponectinu (na 0,7 násobek bazálních hodnot).

Inzulínová rezistence byla nejvyšší ve 12. hodině po operaci, kdy bylo potřeba podat 8násobnou dávku inzulínu oproti výchozí dávce.

ZÁVĚR

V naší studii jsme prokázali, že jak viscerální, tak i subkutánní tuková tkáň je významným producentem prozánětlivých cytokinů. Tyto faktory se pak velmi pravděpodobně podílejí na vzniku pooperační inzulínové rezistence u pacientů po elektivním kardiochirurgickém výkonu.

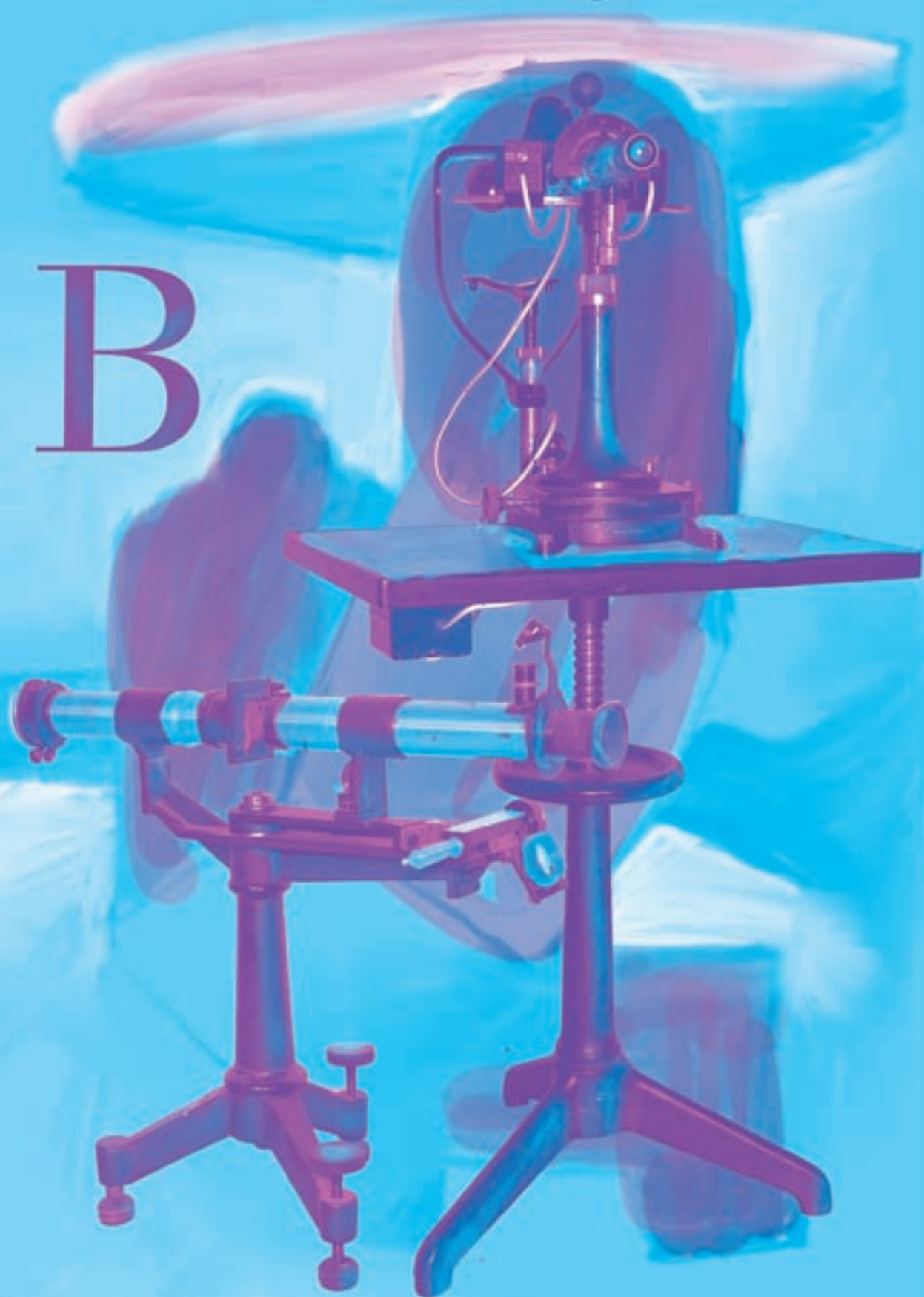
Podporováno projektem CLINICIP a yMSM 0021620814.



Předávání cen v Akademickém klubu 1. LF UK – zleva MUDr. Jaromír Křemen, prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., děkan 1. LF UK.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ POSTERY
VÍTĚZNÉ PRÁCE

B





**VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY**

1. místo: **Dvořák Luboš, MUDr.**

Školitel: prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc.

Název práce: „Ochrana myokardu leukocytární filtrací při srdeční transplantaci: výsledky klinické studie“

2. místo: **Dudek Michal, MUDr.**

Školitel: MUDr. Jarmila Procházková, CSc., RNDr. Pavel Bradna, CSc.

Název práce: „Vliv korozního prostředí na pevnost vazby mezi dentinem a kompozitními výplňovými materiály“

3. místo: **Pavlíček Alexandr - Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF a VFN**

Školitel: Ing. Karel Holada, Ph.D.

Název práce: „Study of biochemical properties of mouse recombinant prion protein“

1. MÍSTO

OCHRANA MYOKARDU LEUKOCYTÁRNÍ FILTRACÍ PŘI SRDEČNÍ TRANSPLANTACI: VÝSLEDKY KLINICKÉ STUDIE**Autoři:** Luboš Dvořák, Jan Pirk, Štěpán Černý, Eva Honsová, Jan Kovář, Bronislav Janek**Školitel:** prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc., Klinika kardiovaskulární chirurgie, IKEM Praha

Luboš Dvořák

Úvod: Při transplantaci srdce (TxS) dochází k reperfučnímu poškození dárcovského myokardu aktivovanými neutrofily. V této práci jsme hodnotili vliv použití leukocytárních filtrů (LF) při reperfuzi dárcovského myokardu na krátkodobé a střednědobé výsledky TxS a porovnávali tuto metodu myokardiální ochrany s technikou prosté sekundární krevní kardioplegie (SKK).

Metodika: V prospektivní klinické studii jsme randomizovali 40 pacientů indikovaných k TxS do skupiny s použitím LF (n = 20), zařazených v mimotělním oběhu a okruhu SKK, a do kontrolní skupiny (n = 20) s použitím pouze techniky SKK. K ověření efektivity LF jsme analyzovali peroperačně krevní obraz, markery myokardiálního poškození (CK-MB, tromboxan B2, troponin I, laktát), biopsie myokardu, uvolněné endotelie (CD 62E), obnovení rytmu a zotavení štěpu. V pooperačním průběhu jsme monitorovali CK-MB, hemodynamické hodnoty, dávky inotropik a řadu dalších klinických ukazatelů. V rámci dlouhodobého pooperačního sledování jsme hodnotili endomyokardiální biopsie a ultrazvukové vyšetření srdce a koronárních tepen.

Výsledky: Ve skupině s LF jsme v porovnání s kontrolní skupinou pozorovali zejména příznivější ultrastrukturální poškození myokardu, nižší markery reperfučního poškození, kvalitnější zotavení a fungování štěpu, příznivější pooperační klinický průběh, i menší výskyt rejekčních epizod v potransplantačním období. Žádný ze sledovaných parametrů nesvědčil významně v neprospěch skupiny s LF.

Závěr: Výsledky studie potvrzují předpokládaný příznivý vliv leukocytární filtrace při reperfuzi srdečního štěpu na ischemicko-reperfuční poškození myokardu. Leukocytární filtrace je efektivní, bezpečná a jednoduchá metoda ochrany myokardu, která zmírňuje následky reperfučního poškození a zlepšuje tak krátkodobé i střednědobé výsledky TxS. Rutinní a systematické používání LF během TxS umožní posoudit dlouhodobý prospěch pro pacienty.

Tato práce je realizována v rámci grantového projektu č. 0361GA MZ ČR.



Předávání cen v Akademickém klubu 1. LF UK, zleva MUDr. Luboš Dvořák, děkan 1. LF UK prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.

2. MÍSTO

VLIV KOROZNÍHO PROSTŘEDÍ NA PEVNOST VAZBY MEZI DENTINEM A KOMPOZITNÍMI VÝPLŇOVÝMI MATERIÁLY**Autor:** Michal Dudek, Pavel Bradna**Školitel:** Pavel Bradna RNDr., CSc., Jarmila Procházková MUDr. CSc.,
Výzkumný ústav stomatologický

Michal Dudek

ÚVOD: Odolnost adhezivního spoje mezi tvrdými zubními tkáněmi a výplňovými kompozity je klíčová pro dlouhodobě úspěšné ošetření těmito moderními materiály. V současné době se objevují nové adhezivní systémy nabízející zjednodušený pracovní postup, ovšem jejich spolehlivost není ověřena dlouhodobými laboratorními a klinickými zkouškami za různých podmínek. Naším cílem bylo porovnat odolnost adhezivního spoje několika odlišných typů adhezivních systémů v roztoku 1,5 % laurylsíranu sodného obsaženého v zubních pastách, modelového dezinfekčního roztoku Corsodyl s obsahem 0,2 % chlorhexidinu, ústní vody Elmex obsahující 0,025 % F a destilované vodě (kontrolní skupina) při expozici po dobu 2 měsíců a teplotě 37 °C.

METODIKA: Testovány byly adhezivní systémy GLUMA COMFORT BOND s pracovním postupem ve dvou krocích (zvláště leptání, priming a bonding společně) a iBOND (leptání-priming-bonding v jednom kroku). Pro každé prostředí bylo připraveno 10 vzorků od každého adhezivního systému (celkem 80 zubů). Použity byly intaktní moláry a premoláry, u nichž po odstranění skloviny byla pomocí adhezivních systémů zhotovena výplň z kompozitního materiálu CHARISMA (vše Heraeus Kulzer). Po skončení expozice byla změřena pevnost vazby ve smyku, vyjádřená v (MPa). Výsledky byly statisticky zpracovány metodou analýzy rozptylu ANOVA a Tukeyho post-hoc testem $p=0,05$. Dále byl pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu hodnocen charakter lomu.

VÝSLEDKY: Po dvouměsíční expozici ve vodě byly největší hodnoty pevnosti a nejvyšší podíl kohezivních lomů, svědčících o velmi dobré adhezi, nalezeny u systému Gluma Comfort Bond v destilované vodě. U tohoto adhezivního systému však došlo v prostředí fluoridačního roztoku ke statisticky významnému poklesu pevnosti vazby (24 -> 18 MPa) oproti kontrolní skupině. V ostatních prostředích a u adheziva iBond nebyly nalezeny statisticky významné změny pevnosti vazby po expozici a četnosti v zastoupení jednotlivých typů lomů.

ZÁVĚR: Pokles pevnosti adhezivního spoje ve fluoridačním roztoku ukazuje na možnost chemické degradace adheziv v tomto prostředí.



Ze slavnostního předávání cen v Akademickém klubu 1. LF UK – poslední kontrola diplomů.

3. MÍSTO

STUDY OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF MOUSE RECOMBINANT PRION PROTEIN**Autor:** Alexandr Pavlíček, Karel Holada**Školitel:** Ing. Karel Holada, Ph.D., Institute of Immunology and Microbiology, 1st Faculty of Medicine*Alexandr Pavlíček*

Prions are class of the infectious agents that cause a group of fatal neurodegenerative diseases in which the cellular form of the prion protein (PrP^C) is transformed into the disease-related scrapie variant (PrP^{Sc}).

The two PrP isoforms differ in biophysical properties. The molecular mechanism by which the PrP^{Sc} is formed and causes infectivity or neurodegeneration is not fully understand.

Two years ago there were reported first cases of the transmission of the PrP^{Sc} by blood transfusion highlighting the need of understanding of PrP interaction with blood cells. For biochemical studies the sufficient amount of PrP is needed what underlines the importance of constructing of recombinant PrP.

We cloned gene of full length mouse prion protein (mPrP) into expression vector pHAT10 and purified it using immobilized metal ion affinity chromatography as his-tagged fusion protein. The insoluble purified mPrP was transformed into soluble form by dialysis using different conditions to refold mPrP in α -helical or β -sheet conformations corresponding with PrP^C and PrP^{Sc}. Refolding was analyzed by measuring of CD spectra and by treatment of mPrP by proteinase K.

GAČR310/04/0419, GAČR310/05/H533



Slavnostní předávání cen v Akademickém klubu 1. LF UK, zleva Alexandr Pavlíček, prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., děkan 1. LF UK.



Na snímku nahoře – šéfredaktorka Zdravotnických novin Mgr. Markéta Mikšová předává zvláštní cenu Štěpánu Sulkovi. Na snímku dole: zleva MUDr. Eva Gottsteinová (AstraZeneca), prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc., prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc., prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., Pavla Pešatová.

ZVLÁŠTNÍ CENY

riho



ZVLÁŠTNÍ CENY

CENA MEDICAL TRIBUNE

Autor: **Dvořák Luboš, MUDr.**

Školitel: prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc.

Název práce: „Ochrana myokardu leukocytární filtraceí při srdeční transplantaci: výsledky klinické studie“

CENA NAKLADATELSTVÍ GALÉN S.R.O.

Autorka: **Kolesová Hana, Mgr.** – Anatomický ústav 1. LF UK

Školitel: prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

Název práce: „Influence of Sonic hedgehog onto the aortic arches development in avian embryos“

CENA ZDRAVOTNICKÝCH NOVIN

Autor: **Sulek Štěpán, 5. r.**

Školitel: doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc.

Název práce: „Polymorfismy genů pro adiponectin a resistin u pacientek s mentální anorexií a obezitou – pilotní studie“



Zástupce Medical Tribune, PhDr. Jan Řezáč, předává zvláštní cenu Medical Tribune MUDr. Luboši Dvořákovi.



Ředitel nakladatelství Galén s.r.o., PhDr. Lubomír Houdek, předává zvláštní cenu nakladatelství Galén s.r.o. Mgr. Haně Kolesové.



Zpracovalo Oddělení vnějších vztahů 1. LF UK

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

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

Fotografie Mgr. Karel Maister

Sazba Kateřina Dvořáková, Galén

Tisk GLOS, Špidlenova 436, 513 01 Semily

ISBN 80-7262-442-3

2006

