

## **Sarkoplazmatické retikulum hraje větší roli v regulaci tonu plicních cév u samic než u samců**

**A. Baňasová, J. Bíbová, V. Hampl**

Ústav fyziologie, UK 2. LF, Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév

Rozdíly mezi muži a ženami ve vlastnostech oběhového systému jsou běžně přijímaným faktem, avšak mechanismy, které za ně zodpovídají, nejsou dostatečně jasné. V rámci studia podílu uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula (SR) na mechanismu hypoxické plicní vazokonstrikce jsme zaznamenali rozdílné výsledky u samců a samic. V této práci jsme proto testovali hypotézu, že podíl  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula v regulaci tonu plicních cév se liší mezi pohlavími.

Izolované plíce laboratorních potkanů kmene Wistar, anestetizovaných thiopentalem (40 mg/kg IP), jsme ventilovali normoxickou směsí plynů (21%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  + %  $\text{N}_2$ ). K perfúzi jsme použili solný roztok s albuminem (4g/100ml), meklofenamátem ( $17 \times 10^{-6}\text{M}$ ) a L-NAME ( $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ). Úlohu SR jsme studovali pomocí vysoce selektivního blokátoru  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-asy SR (SERCA), thapsigarginu ( $10^{-8}\text{M}$ ).

Měřili jsme zvýšení perfúzního tlaku po podání angiotenzinu II (0.2ug) a při hypoxii (0%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  + 95%  $\text{N}_2$ ). Průtok byl konstantní, a proto změny perfúzního tlaku přímo odrážely změny plicní cévní rezistence.

Zjistili jsme, že u samic thapsigargin významně snižuje tlakovou odpověď jak na angiotenzin ( $2.2 \pm 0.8$  vs.  $9.9 \pm 2.5$ ,  $p < 0.05$ ), tak i na hypoxii ( $4.6 \pm 1.2$  vs.  $21.2 \pm 2.0$ ,  $p < 0.001$ ), zatímco u samců se statisticky významně nemění ani odpověď na angiotenzin ( $6.5 \pm 1.3$  vs.  $8.2 \pm 3.7$ ,  $p = 0.60$ ), ani odpověď na hypoxii ( $12.5 \pm 3.5$  vs.  $17.3 \pm 2.8$ ,  $p = 0.21$ ).

Tyto výsledky tedy ukazují, že  $\text{Ca}^{2+}$  ze SR se významně podílí na mechanismu plicní vazokonstrikční odpovědi na hypoxii a angiotenzin II, avšak pouze u samic. U samců je podíl retikula na těchto odpovědích minimální.

Práce je financována grantem GAČR 305/00/1432

## **Vyšetření generalizovaného neuroblastomu metodami molekulární a klasické cytogenetiky**

**Bedrníček J., Kučerová H., Vícha A., Stejskalová E., Eckschlager T.**

Klinika dětské onkologie - laboratoř průtokové cytometrie a molekulární biologie, UK  
2.LF

školitel: Doc. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Na kazuistice tříleté pacientky s generalizovaným neuroblastomem se snažíme dokumentovat možnosti a význam metod molekulární i klasické cytogenetiky. Komparativní genomická hybridizace (CGH) je molekulárně cytogenetická metoda vhodná k detekci amplifikací a delecí, která se využívá zvláště u nádorů. Její výhodou je možnost vyšetření i nedělicích se buněk včetně archivního materiálu. Pomocí CGH jsme zjistili ztrátu genetického materiálu 1p, 1q, chromozómu 3, 10q, 13q a 22p a zmnožení 2p, 13q, 17q, chromozómu 19 a 22q. Prokázali jsme i změny nejčastěji popisované jako markery nepříznivé biologické povahy nádoru - amplifikace NMYC (2p24.1), delece 1p36 a zmnožení genetického materiálu 17q. Tyto změny, které se u neuroblastomu vyskytují častěji, jsme potvrdili i fluorescenční in situ hybridizací (FISH). Vyšetřením karyotypu jsme potvrdili monozomii chromozómu 3. Porovnáním cytogenetického vyšetření s výsledky CGH jsme dospěli k závěru, že amplifikace NMYC byla ve formě double minutes. Chromozomální změny zjištěné klasickým cytogenetickým vyšetřením zahrnovaly komplexní přestavby, včetně ring chromozómu či translokace části 1q na 3. chromozóm. Cytometrická DNA analýza neprokázala aneuploidii. Výše uvedenou kazuistiku demonstrujeme jako příklad komplexně pojaté cytogenetické diagnostiky pacientů se zhoubnými nádory. Cílem vyšetření je zpřesnění prognostiky nádorů tak aby byla možná adekvátní terapie (tzv. risk adapted therapy).

## **Expres preproorexinové mrna v laterálním hypothalamu sibiřských křečků.**

**Bronský J.<sup>1</sup>, Průša R.<sup>1</sup>, Mercer J.G.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06, Praha 5 – Motol

<sup>2</sup> The Rowett Research Institute, Greenburn Road, Aberdeen, AB21 9SB, Scotland  
Školitel: doc. MUDr. Richard Průša, CSc.

Orexiny A a B jsou hypothalamické neuropeptidy vznikající ze společného prekursoru - preproorexinu. Podílejí se na regulaci příjmu potravy a energetické rovnováhy organismu. Studium jejich exprese za podmínek různé délky osvětlení a při omezeném příjmu potravy může objasnit, zda se orexiny účastní změn spojených s uvedenými vlivy. Někteří savci mění v průběhu ročních období svou hmotnost v závislosti na době osvětlení. Sibiřský křeček za podmínek zkrácené doby osvětlení („short day“; 8 hodin světlo, 16 hodin tma) sníží svou hmotnost až o 30% během 18 týdnů ve srovnání s kontrolami („long day“; 16 hodin světlo, 8 hodin tma). S tím spojené změny v expresi hypothalamických neuropeptidů jsou organismem vnímány jako fyziologické. Naopak restrikce příjmu potravy vyvolá pokles hmotnosti, který je vnímán jako inadekvátní a hypothalamické regulační peptidy jsou exprimovány odlišně. V našem experimentu bylo letní a zimní období imitováno změnou umělého osvětlení. Přítomnost preproorexinové mRNA v laterálním hypothalamu byla zjišťována metodou in situ hybridizace s použitím cRNA sondy značené <sup>35</sup>S nebo digoxigeninem. Na základě počítačové analýzy 20um kryostatických řezů hypothalamické oblasti nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi preproorexinové mRNA za podmínek různé doby osvětlení nebo při omezeném příjmu potravy ve srovnání s kontrolní skupinou. Orexiny se tedy pravděpodobně významným způsobem nepodílejí na uvedených změnách u těchto organismů. U člověka může stanovování plazmatických hladin orexinů poukázat na jejich úlohu v patofyziologii různých onemocnění.

Práce byla podpořena stipendiem Danone institutu.

# VLIV VERGENCE NA VESTIBULOOKULÁRNÍ REFLEX

Brzezny R., Černý R., Jeřábek J.

Neurologická klinika dospělých, UK 2.lf a FN Motol

Školitel: Doc.MUDr. J.Jeřábek,Csc.

Vzájemná interakce semicirkulárních kanálků a otolitových struktur je základním předpokladem pro percepci a regulaci pohybu. Semicirkulární kanálky detekují úhlovou akceleraci, otolity akceleraci lineární. Excentrická sinusová rotace umožňuje zkoumat interakci lineárního a úhlového vestibulookulárního reflexu (VOR).

Zatímco úhlová akcelerace je nezávislá na excentricitě rotace (angular VOR) , je lineární tangenciální akcelerace na tuto excentrickou rotaci lineárně vztahována (linear VOR). Lineární akcelerace interaguje s angulárním VOR, což vede k modulaci intenzity VOR (gainu) během excentrické sinusové rotace. Uložením vyšetřovaného subjektu mimo osu rotace dojde ke zvýšení gainu VOR. Výslednou reakci lze ovlivnit zrakovou fixací a významný vliv zde hraje vzdálenost fixačního bodu. Zvýšení gainu je přibližně lineárně vztahováno a nepřímo úměrné ke vzdálenosti od sledovaného objektu. Uložením sledovaného objektu mezi centrum a subjekt, dochází k snížení gainu a stejně tak k inverzi fáze VOR.

Pokusné osoby byly sinusově rotovány s frekvencí 1Hz, aby byl vyšetřen vliv otolitového systému a vyloučen vliv plynulých sledovacích pohybů očních. Hlava byla umístěna excentricky a byla dislokována 50 cm do záklonu, přičemž byla zachována její anteflexe shodná s centrickou rotací, aby byly stejně stimulovány polokruhové kanálky. Záznam očních pohybů byl prováděn standardní elektronystagmografickou metodou (ENG), která využívá metodu záznamu elektrického dipólu z povrchových elektrod lepených v očních koutcích.

Výsledky analýzy ENG potvrzují, že umístění fixačního bodu mezi centrum rotace a excentricky umístěnou hlavu pokusné osoby, statisticky významně mění fázový posun a dochází k obrácení směru funkce VOR. Při fixaci bodu stejně vzdáleného je odpověď modulována excentrickým umístěním hlavy.

## **P-GLYKOPROTEIN U RECIDIVUJÍCÍCH NÁDORŮ**

**Černá D., Kučerová H., Eckschlager T.**

Klinika dětské onkologie - laboratoř průtokové cytometrie a molekulární biologie, FN Motol

školitel: Doc. MUDr. Tomáš Eckschlager

P- glykoprotein (PGP) je membránový fosfoglykoprotein patřící do rodiny ABC-transportních proteinů, to znamená do skupiny bílkovin buněčné membrány, které využívají k transportu látek energii z fosfátových vazeb. PGP je kódován *mdr1* a *3* genem lokalizovaném na dlouhém raménku 7. chromozomu (obl. q36) a je zodpovědný za vznik mnohočetné lékové rezistence (MDR). Příčinou vzniku rezistence je zvýšené vyplavování jinak účinného cytostatika (antracykliny, aktinomycin D, vinca alkaloidy apod) z buňky, což znemožní jeho působení v nádorové buňce. PGP se za normálních okolností vyskytuje i v buňkách zdravého organismu např. v nadledvinách, v lumen ledvin, jater a střeva. U nádorů se nachází typicky u AML i ALL, CML, NHL, neuroblastomu, a to zvláště po chemoterapii, což svědčí o adaptaci tumorosních buněk na léčbu. U některých nádorů již bylo prokázáno, že je známkou nepříznivé prognosy (AML některé sarkomy).

Cíle: Ověřit zda je u recidivujících nádorů vyšší exprese PGP.

Metoda: PGP byl prokázán imunologicky průtokovým cytometrem v suspenzích nádoru. Menší část pacientů byla vyšetřena i nově zaváděným buněčným testem s fluorescenčním barvivem Rhodamin 123. Vyšetřili jsme 150 nádorů, z toho 32 v době relapsu.

Výsledky: Část pacientů s relabujícími nádory (42%) zvýšeně exprimovala PGP. Při podrobnější analýze prokazujeme zvýšené hodnoty PGP u chemorezistentních nádorů. U části relabujících pacientů jsme prokázali i jeho funkci.

Závěry: Vyšetření PGP umožní odhalit nádory rezistentní k řadě cytostatik. Význam, tohoto vyšetření pro klinickou praxi je zatím sporný, i když probíhají klinické studie s inhibitory funkce PGP neboli chemosenzitory (např. blokátory kalciového kanálu, imunosupresivní látky, antibiotika atd.).

## **ALELICKÁ DISKRIMINACE POMOCÍ PCR V REÁLNÉM ČASE: STUDIE GENU NEUROD1**

**Pavel Dřevínek, Ondřej Cinek, Pavlína Sedláková, Jan Vavřinec**

2.dětská klinika 2.LF UK

Školitel: Prof. P. Goetz, CSc.

Gen neurod1 kóduje jeden z transkripčních faktorů inzulínového genu. Leží v oblasti lokusu IDDM7, pro něhož byla nalezena vazba s diabetes mellitus (DM) 1. typu. Na genu je popsáno několik jednonukleotidových polymorfismů (SNP), z nichž Ala45Thr vykazuje v některých populacích asociaci s DM 1. typu. Cílem této práce bylo vyšetřit asociaci dvou SNP, Ala45Thr a Pro197His, s DM 1. typu v české populaci a k rozlišení jednotlivých alel neurod1 využít potenciálu real-time PCR.

Do studie bylo zařazeno 311 pacientů s DM 1. typu (160 chlapců, 151 dívek, věk manifestace 0-18 let,  $8,0 \pm 4,3$  roku) a 290 zdravých nediabetických kontrol bez známek autoimunity (věk  $8,5 \pm 3,9$  roku). Vzorky byly vyšetřeny na oba polymorfismy pomocí PCR v reálném čase. Prvních 300 vzorků bylo paralelně testováno na Ala45Thr metodou PCR-RFLP.

Detekce SNP pomocí PCR v real-time formátu je prováděna párem reakcí se sekvenčně specifickými primery (SSP). Každá reakce určuje jednu z alel daného SNP; výsledek těchto dvou reakcí ukazuje homozygotní či heterozygotní stav genu. Navíc je v každé reakci přítomen systém pro amplifikaci konzervativní sekvence (albumin), který slouží jako interní kontrola proběhlé PCR.

Při porovnání výsledků získaných standardní metodou (RFLP) s nově vyvinutou real-time PCR-SSP byla zjištěna diskrepance ve dvou případech z 300 vzorků. Real-time PCR metodika tedy nabízí validní výsledky bez nutnosti elektroforetické post-PCR analýzy. Rozložení alelických variant Ala45Thr se signifikantně liší mezi pacienty s DM 1. typu a kontrolami po adjustaci na přítomnost HLA molekul, které jsou pro DM 1. typu rizikové, a na genotyp polymorfismu inulínového genu -23HphI. Genotyp Ala/Thr přináší riziko diabetu  $OR=2,01$  (CI 95% 1,26-3,26) a genotyp Thr/Thr riziko  $OR=2,10$  (CI 95% 1,07-4,09) vztaženo ke genotypu Ala/Ala. Alelické frekvence Pro197His se mezi pacienty a kontrolami signifikantně neliší. Tento nálezn potvrzuje asociaci polymorfismu Ala45Thr genu neurod1 s DM 1. typu, která je pravděpodobně ovlivněna interakcí s HLA molekulami.

*Podpořeno granty GAUK 58/2001, IGA 6503 a Nadací na podporu a ochranu dětí a nezletilé mládeže Lvíče, ČR*

## **Hodnocení posturálních funkcí dítěte se zaměřením na včasnou identifikaci odchylek od fyziologického vývoje**

**Robert Frei**

Pracoviště: Klinika rehabilitace FN Motol

Školitel: Doc.PaedDr.Pavel Kolář

Dítě se rodí s funkčně nezralým CNS. Motorické chování v postnatálním období společně s CNS teprve maturuje. S tímto dozráváním jsou spojené též funkční změny v oblasti pohybových projevů. V rámci fyziologického postnatálního vývoje existuje časově specifická posloupnost kvalitativně odlišné motoriky. Není-li vývoj optimální, je možné patologii odhalit právě z odklonu od chronologie či ze změn kvality pohybových dovedností.

Pro hodnocení postnatální ontogeneze CNS a s ní provázaných změn v motorickém chování je možné využít pozorování vývoje spontánní motoriky, posturální reaktivity a dynamiky „primitivních“ reflexů.

Standardizace vyšetřovacích postupů se zaměřením na výše uvedené vývojové změny znamená přesné vymezení základních modelů spontánního chování dítěte, dynamiky „primitivních“ reflexů a posturální reaktivity ve zmiňovaném období postnatálního ontogenetického „boomu“ CNS.

Správná interpretace získaných údajů dokáže lékaře upozornit na relevantní odchylky již do 3 měsíce života dítěte.

Včasná diagnostika, brzká adekvátní terapie, vyšší úspěšnost léčby s jejím časnějším zahájením.

## **Plica mediopatellaris – nový pohled**

**MUDr. Petr Geřábek, MUDr. Petr Šebesta**

Pracoviště funkční anatomie 2.LF UK Praha

Školitel: Prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.

Plica mediopatellaris se dnes, s masivním rozvojem artroskopie, stala velmi častou diagnosou s nejasnou etiologií, zejména v dětském věku. Jako dg. je charakterisována zejména bolestivostí, dyskomfortem, „maltrackingem“ čéšky a omezenou hybností. Jedná se v podstatě o pouhou duplikaturu synoviální výstelky kloubu, tenkou a jemnou strukturu, která se opakovanou traumatisací může změnit v patologickou (zbytnělou a fibrotisovanou) a vést k mechanickému poškození kloubní chrupavky.

Proti vžitému názoru, že se jedná o zbytek embryonální mesenchymální tkáně persistující v těle od narození je třeba se ohradit, neboť děje probíhající při formování kolenního kloubu jsou velmi dobře popsány a pro toto tvrzení není žádný reálný podklad (na rozdíl od obdobných struktur infra- a suprapatelárně). Naopak se zdá, že plika se v kloubu vyvíjí až následkem nějakého primárního úrazu či zásahu, který nemusí být velký, ale způsobí dočasnou instabilitu kloubu, pro změnu v patologickou pliku pak je potřeba další insult. (Teprve poté se plika stane bolestivou, do té doby v ní nejsou sensitivní nervová zakončení)

Jako obranný mechanismus proti instabilitě má tělo k dispozici 2 mechanismy: jednak reflexní zvýšení tonu okolních svalů, což je reakce akutní a krátkodobá, jednak stabilisace kloubu zesílením pouzdra, tedy vytvořením pliky. Při typickém úrazovém mechanismu, kdy násilí přichází z laterální strany, dojde k poškození mediálního pouzdra, lateralisaci čéšky a zvětšení valgosity v zátěži. Logicky pak plika vzniká právě na mediální straně a působí tak proti uvedeným skutečnostem. Přínos pro kliniku je zřejmý – jednak je potřeba velmi uvážlivě při artroskopii rozhodovat o eventuální discisi, ta by se měla provádět jen při patologické plice, zároveň se zdá vhodné u lehčích úrazů kolenního kloubu fixovat pouze antalgicky a časně mobilisovat, zejména pak posilovat mediální vastus.

Naši teorii jsme ověřili experimentálně na kadaverech čerstvých i fixovaných, měřeními na RTG snímcích, vyšetřováním operovaných pacientů a pomocí dotazníku a vše zatím nasvědčuje správnosti naší teze.

Traumatologie dětské horní končetiny s ohledem na kostní maturaci.

Havlas V. ,Ortopedická klinika dětí a dospělých UK 2. LF a FN Motol.

Autoři ve své přednášce hodnotí typy úrazů horní končetiny v jednotlivých růstových etapách vývoje skeletu horní končetiny u dítěte. Snaží se najít přímou závislost mezi daným vývojovým stupněm skeletu a dominujícím typem poranění skeletu horní končetiny. Z rozboru vyplývá závislost daná determinací obdobími relativního růstového klidu a naopak období růstových akcelerací. Tato souvislost se ukazuje zřejmá.



## Podání antioxidantu N-acetyl-L-cysteinu inhibuje hypoxií indukovanou kolagenolytickou aktivitu v plicích

Daniela Hermochová<sup>1</sup>, Jana Novotná<sup>2</sup>, Jan Herget<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav fyziologie 2. Lékařské Fakulty University Karlovy, Praha

<sup>2</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie 2. Lékařské Fakulty University Karlovy, Praha,

<sup>1,2</sup>Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév. Školitelka: RNDr. Jana Novotná, CSc

Chronická hypoxie působí plicní hypertenzi, jejíž příčinou je strukturální rekonstrukce plicního řečiště. Naše předešlé výsledky nasvědčují tomu, že v patogeneze hypoxické plicní hypertenze (HPH) se uplatňují reaktivní sloučeniny kyslíku tím, že aktivují kolagenolytické enzymy, matrixové metalloproteinázy (MMP). Naštěpením kolagenu vznikají nízkomolekulární kolagenní fragmenty, které stimulují k proliferaci hladké svalové buňky a fibroblasty medie plicních arterií. Podání antioxidantů brání rozvoji (HPH) (1). V našem pokuse jsme se snažili prokázat, že antioxidant N-acetyl-L-cystein (NAC) inaktivací radikálů může inhibovat chronickou hypoxií navozenou zvýšenou kolagenolytickou aktivitu v plicní tkáni.

Experiment jsme prováděli na čtyřech skupinách dospělých laboratorních potkanů (n=5). První skupina dostávala NAC v pitné vodě (dávka 20g/l H<sub>2</sub>O) po 8 dnů. První 4 dny v normoxii, druhé 4 dny v hypoxii (F<sub>iO<sub>2</sub></sub>=0,1). Druhá skupina byla vystavena po 4 dny hypoxii a nedostávala NAC. Třetí skupina sloužila jako normoxické kontroly bez NAC. Čtvrtá skupina dostávala po 8 dní NAC v normoxii. Odebrali jsme vzorky celé plicní tkáně a pomocí zymografie (substrát - želatina) identifikovali obsažené enzymy. Výsledné gely byly zpracovány pomocí programu pro denzitometrické vyhodnocování polyakrylamidových gelů Elfoman 2.0. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí ANOVA.

Expozice chronické hypoxii působila signifikantní (P<0,005) zvýšení proenzymu i aktivního enzymu želatinázy B (MMP-9). Zvýšení byla inhibována (P<0,01) podáním NAC hypoxickým zvířatům a hodnoty proMMP-9 a MMP-9 se nelišily od těch, nalezených u zvířat normoxických. Aktivita datších sledovaných metaloproteinás (proMMP2, MMP2, proMMP13 a MMP13) nebyla hypoxií ani podáváním NAC signifikantně ovlivněna.

Podání antioxidantu NAC brání hypoxické remodelaci plicního cévního řečiště inhibicí kolagenolýzy.

1. Herget, J. et al.: *Physiol. Res.* 49: 493 - 501, 2000.

Práce je financována grantem GAČR 305/97/S070

## Refrakční aspekty chirurgie katarakty u těžkých hypermetropů

**Hložánek M., Korynta J.**

Oční klinika UK 2.LF a FN Motol, Praha

školitel: doc. MUDr. Jiří Korynta, CSc.

### **Abstrakt:**

Operace šedého zákalu se provádí v různých modifikacích asi 4000 let. Dlouhá staletí se operativa omezila na reklinaci čočky. Až v r.1949 Ridley naimplantoval do oka první umělou nitrooční čočku (IOČ). V současnosti je technika operace včetně implantace IOČ již natolik rutinní výkon, že v jeho indikacích se začíná objevovat i odstranění čiré čočky z refrakčních důvodů a operace čočky tak již dnes spadá do podoboru refrakční chirurgie. Úspěch operace z hlediska pooperační refrakce je do značné míry závislý na předoperačních výpočtech. K nim je zapotřebí přesné proměření délky oka ultrazvukem a optické mohutnosti rohovky, neméně však i přesný vzorec k výpočtu požadované pooperační refrakce.

Výpočet optické mohutnosti implantované IOČ prodělává neustálý vývoj. V současnosti jsou užívány vzorce IV. generace, jejichž základním rysem je, že užívají k výpočtu jednak matematické zákony optiky a jednak některé parametry výpočtu empiricky modifikují dle výsledků zpracování velkých souborů odoperovaných pacientů. Spojují tak v sobě dva základní směry dosavadních vzorců, z nichž přesnější byly oproti očekávání empirické vzorce. Přes neustálé zpřesňování současné často složité vzorce stále zaostávají při výpočtu emetropické IOČ u očí s extrémní axiální délkou.

Jelikož nepřesnost výpočtu u dlouhých očí souvisí zejména s jejich obtížnou měřitelností, soustředili se autoři na zpřesnění výpočtu IOČ u hypermetropů. Spoluprací se 4 pracovišti z ČR byl vytvořen soubor 429 očí. V tomto souboru převažovaly bulby s krátkou axiální délkou (AL): 304 očí s  $AL < 22$  mm, průměrná AL souboru 21,54 mm. Několika ucelenými matematickými kroky vytvořili autoři úpravu nejužívanějšího vzorce současnosti. Tento nový vzorec vykazuje vyšší přesnost než běžně užívané vzorce.

## **Plicní vazokonstrikce brání arteriální hypoxémii**

**Hodyc D., Lachmanová V.**

Ústav fyziologie, UK 2. LF, Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév.  
Školitel: Prof. MUDr. Jan Herget, DrSc.

Hypoxická plicní vazokonstrikce je základní regulační mechanismus, který činí optimálním transport kyslíku plicemi při nerovnoměrné plicní ventilaci. Zvýšení odporu průtoku krve v hypoventilovaných oblastech plic brání venózní příměsi. Nejasný je význam HPV při globální plicní hypoxii (vdechování vzduchu chudého na O<sub>2</sub>). Podle naší hypotézy i v tomto případě může HPV vzhledem k odlišnostem v distribuci kritického uzavíracího tlaku v jednotlivých částech plicního cévního řečiště bránit vzniku arteriální hypoxémie.

Pokusy byly prováděny na izolovaných plicích ze samců laboratorního potkana, perfundovaných solným roztokem s albuminem (4g/100ml), L-NAME (5x10<sup>-5</sup>M), meklofenamátem (17 x 10<sup>-6</sup> M) a ventilovaných 21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> a nebo 10, 5, 3 a 0% O<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub> při vyvolávání akutní hypoxie. Plíce byly perfundovány konstantním průtokem (4 ml/min/100 g t. hm.) a byl registrován arteriální perfúzní tlak. Plicní venózní PO<sub>2</sub> (P<sub>v</sub>O<sub>2</sub>) bylo kontinuálně registrováno O<sub>2</sub> elektrodou připojenou odtokem k venózní kanyli. Zjistili jsme, že P<sub>v</sub>O<sub>2</sub> je v nepřímé úměrnosti k velikosti HPV. Inhibice HPV nitroprusidem (20 μM) při ventilaci plic směsí 0%O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> působila prohloubení hypoxémie v plicní venózní krvi. Před podáním nitroprusidu P<sub>v</sub>O<sub>2</sub> pokleslo při hypoxii o 32,8 ± 0,7 (SEM) torr, po podání o 58 ± 7,9 torr (n=5, P<0,005). Následné zvýšení perfúzního tlaku přidáním 30 mM K<sup>+</sup> P<sub>v</sub>O<sub>2</sub> zvýšilo. Vzhledem k tomu, že byly plíce perfundovány solným roztokem s albuminem, jsou změny PO<sub>2</sub> výraznější, než by bylo možno očekávat při perfúzi médiem obsahujícím hemoglobin.

Závěr: V podmínkách celkové ventilační hypoxie plic plicní vazokonstrikce brání vzniku hypoxémie.

Práce je financována grantem GAČR 305/97/S070

## INHIBIN B, FOLIKLY STIMULUJÍCÍ HORMON, LUTEINIZAČNÍ HORMON A TESTOSTERON U CHLAPCŮ V DĚTSTVÍ A BĚHEM PUBERTY

<sup>1</sup> Chada M., <sup>1</sup> Průša R., <sup>2</sup> Lisá L.

<sup>1</sup> Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2. LF UK a FN v Motole, Praha

<sup>2</sup> I. dětská klinika 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Inhibin B je gonadální heterodimerický polypeptidový hormon. Je produkován v Sertoliho buňkách v testes a reguluje pomocí negativní zpětné vazby syntézu a sekreci folikly stimulujícího hormonu (FSH) z adenohipofýzy.

*Cíl studie:* Stanovit hormonální profily ve vylučování inhibinu B, FSH, luteinizačního hormonu (LH) a testosteronu u chlapců v dětství a během puberty. Určit jejich vzájemné vztahy v regulaci hypotalamo-hypofyzární-gonadální hormonální osy.

*Metodika:* 78 zdravým chlapcům rozděleným do 11 věkových skupin, od narození do konce puberty, byly standardním způsobem odebrány vzorky srážlivé krve. Stádia pubertálního vývoje byla určena metodou dle Tannera. Ve všech vzorcích séra byly stanoveny inhibin B (ELISA), FSH, LH (chemiluminescent microparticle immunoassay – CMIA) a testosteron (RIA). Výsledky byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru (mean  $\pm$  SEM). Pomocí Mann-Whitney U testu byly porovnány průměry jednotlivých věkových skupin. Regresní analýza určila korelační koeficienty. Hodnota při  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou.

*Výsledky:* Po porodu se začaly zvyšovat sérové hladiny inhibinu B, FSH, LH a testosteronu a dosáhly nejvyšších hodnot ve 3.- 4. měsíci: inhibin B ( $313,9 \pm 11,1$  pg/ml; mean  $\pm$  SEM), FSH ( $1,83 \pm 0,14$  UI/l) a LH ( $0,89 \pm 0,21$  UI/l). Poté došlo k postupnému snižování sérových hladin všech hormonů a k dosažení prepubertálních hodnot. S rozvojem puberty byla pozorována statisticky významná elevace sérových hladin. Inhibin B dosáhl nejvyšších hladin v pubertálním stádiu G2 ( $174,5 \pm 11,1$  pg/ml), poté jeho hladina mírně poklesla. Sérové hladiny FSH, LH a testosteronu se zvyšovaly s postupujícím pubertálním vývojem. Během prvních 2 let po porodu byl pozorován velmi silný vztah mezi inhibinem B a FSH, LH a testosteronem ( $r = 0,83; 0,65; 0,58$ ;  $p < 0,001$ ; respektive). V pubertálním stádiu G2 měl inhibin B silný vztah k LH a testosteronu ( $0,62; 0,64$ ;  $p < 0,05$ ). Ve stádiu G3 si inhibin B vytvořil velmi silnou vazbu k FSH ( $-0,57$ ;  $p < 0,05$ ).

*Závěr:* Inhibin B hraje důležitou roli v regulaci hypotalamo-hypofyzární-gonadální hormonální osy, která je aktivována v prvních měsících po porodu a na začátku puberty. Inhibin B je přímým markerem přítomnosti Sertoliho buněk nezbytných pro zrání germinálních buněk.

## Gap junctions a jejich úloha při objemových změnách buněk v míše potkana

A. Homola (1,2), L. Vargová (1,2), E. Syková (1,2)

1) Ústav neurověd a Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, 2.LF, UK, Praha

2) Ústav neurověd, Ústav experimentální medicíny, AVČR, Praha

Objemové změny buněk jsou častým průvodním jevem řady patologických stavů v centrálním nervovém systému. Jejich podstatou jsou přesuny některých iontů a vody mezi intra- a extracelulárním prostředím, které v důsledku vedou ke změnám objemu buněk (především gliových), velikosti a prostorového uspořádání extracelulárního prostoru (ECP). Sledováním změn difúzních parametrů ECP (objemové frakce  $\alpha$  a tortuosity  $\lambda$ ) v reálném čase můžeme nepřímo posuzovat i změny objemu buněk. Cílem naší studie bylo posoudit úlohu gap junctions v těchto pochodech pomocí jejich funkční blokády. Naše pokusy byly provedeny na 400-500  $\mu\text{m}$  silných řezech získaných z izolované míchy 10-12 dní starých potkanů. Zvětšení objemu buněk bylo vyvoláno aplikací fyziologického roztoku s vyšším obsahem  $\text{K}^+$  (50 mM) nebo aplikací kainátu v koncentraci  $10^{-4}\text{M}$ , blokáda gap junctions byla navozena předchozí inkubací řezů s carbenoxolonem. Po celou dobu aplikace jsme sledovali změny difúzních parametrů ECP. V dalších pokusech jsme pomocí  $\text{K}^+$  selektivních mikroelektrod korelovali tyto změny se zvýšením koncentrace extracelulárního  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_e^+$ ). Výsledky našich pokusů ukázaly statisticky významné rozdíly ve změnách objemové frakce ECP: po aplikaci 50 mM roztoku  $\text{K}^+$  došlo po blokádě gap junctions k poklesu  $\alpha$  na  $0.06 \pm 0.01$ , v kontrolních řezech byl pokles  $\alpha$  nižší ( $0.09 \pm 0.04$ ); po aplikaci kainátu byl maximální pokles  $\alpha$  na  $0.12 \pm 0.02$ , v kontrolních řezech byl pokles opět nižší ( $\alpha = 0.17 \pm 0.01$ ). Blokáda gap junctions byla doprovázena větším vzrůstem koncentrace  $\text{K}_e^+$  (13 mM) po podání kainátu než v kontrolních řezech (8 mM). Uzavíráme, že po blokádě gap junctions carbenoxolonem dochází k významnějšímu zvětšení objemu buněk a k větší změně koncentrace  $\text{K}_e^+$ . Gap junctions v gliových buňkách tudíž hrají důležitou úlohu v udržování homeostázy objemu ECP.

**Evidence-based medicine (EBM) -  
algoritmus vyhledávání relevantních informačních zdrojů v medicíně.  
Demonstrace na konkrétních příkladech v pediatrii.**

**Janda A<sup>1,2</sup>, Adla T.<sup>1</sup>, Feberová J.<sup>1</sup>, Kasal P.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Ústav lékařské informatiky UK 2. LF, Praha

<sup>2</sup> 1. dětská klinika Fakultní nemocnice Motol a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Kasal, Csc.

Práce se zabývá metodologií používání informačních zdrojů ve zdravotnictví, nazývané „Evidence-based medicine“, česky „Medicína založená na důkazech“. EBM je postup usnadňující lékaři orientaci v odborné literatuře, umožňuje mu klinické rozhodování na základě kritického zhodnocení zdravotnických informací s různou silou důkazu. Používání tohoto postupu a zdrojů, které vznikly s použitím principů EBM, by mělo lékařům umožnit racionálně využívat výsledky klinického výzkumu v praxi a tím zefektivnit péči o pacienty.

Formou vývojových diagramů je představen postup při vyhledávání informací v databázích vycházejících z EBM principů (TRIP, DARE, MEDLINE, EMBASE, Cochrane Library of Systematic Reviews, ACP Journal Club and Best Evidence a Clinical Evidence). Součástí práce je charakteristika jednotlivých databází, se zaměřením na procentní podíl typů studií (metaanalýzy, systematické přehledy, randomizované studie, klinické studie atd.), a jejich dostupnost v České republice.

Na konkrétních příkladech z klinické praxe pediatra, které se týkají etiologie, diagnózy, léčby, prevence a prognózy onemocnění dětských pacientů, je demonstrován výše popsáný postup. Zároveň je zde srovnáván výsledek vyhledávání v běžně dostupných tištěných učebnicích s výstupy vzešlými z EBM databází, jak z hlediska časové náročnosti, sensitivity a specifity vyhledávání, tak především síly důkazu, která v literatuře předkládané argumenty podporuje. Závěrem je uveden seznam publikací o Evidence based medicine v češtině. Z práce, mimo jiné, vyplývá jednoznačné doporučení k nákupu licence zahrnující EBM databáze pro FN Motol.

## **ŘEŠENÍ STENÓZ A STRIKTUR HRTANU A PRUDUŠNICE U DĚTÍ POMOCÍ DILATAČNÍCH STENTU VYROBENÝCH Z KOPOLYMERU NA BÁZI POLY-HEMA / průběžná zpráva/**

**Janoušek P. , Kabelka Z.**

Klinika ušní,nosní, krční UK 2.LF, subkatedra IPVZ

Stenózy hrtanu a průdušnice tvoří významnou součást spektra diagnóz pacientů léčených na klinikách ORL, chirurgie hlavy a krku. Akutní léčba má jasné řešení v intubaci či chirurgickém zpřístupnění dýchacích cest zejména tracheotomií. Pro dlouhodobou léčbu chronických stenózujících procesů není však zatím spolehlivé, dostatečné a přitom levné řešení. Dominantní léčbou je radikální chirurgická resekce s následnou plastikou. U dětí nenašly rozsáhlé chirurgické rekonstrukce tak velkého uplatnění jako u dospělých. Dilatace stenóz a striktur pomocí stentů se jeví jako výhodné pro využití u dětských pacientů.

Snahou je vyvinout takový stent který bude kombinací svých vlastností/ pevnost, nasákavost, biokompatibilita, mikrobiální inertnost/ vhodný pro klinické využití.

Stenty jsou vyvíjeny polymerací hydroxyethylmethakrylátu / poly-HEMA/ o různé koncentraci na korpusy z hedvábí polyethylentereftalátového typu/ Dakron/. Materiál poly- HEMA je registrován SUKL a dlouhodobě klinicky využíván / neurochirurgie, oftalmologie/. Vykazuje vynikající biokompatibilitu, a další výhodné fyzikální vlastnosti/ botnavost, nasákavost/. V této indikaci – výroba stentů – však nebyl dosud využit.

Stenty jsou testovány ohledně fyzikálních vlastností / pevnost v tahu, Yongův modul /. Na samotný materiál jsou očkované kultury běžných oportunních i obligatorních patogenů horních cest dýchacích a hodnocen jejich růst. Vlastním pokusem je pak implantace stentů do krční části průdušnic laboratorních potkanů s předem experimentálně vytvořenou stenózou.Tato zvířata budou nadále sledována, hodnocen jejich stav/ pletysmografie, endoskopie/.Na závěr bude zhodnocena při sekci lokální reakce na stent.

Hodnocením vlastností materiálu spolu s výsledky experimentu na zvířeti bude stent s optimálním složení polymeru postoupen dalším testům ke klinickému použití.

## **Využití PCR v diagnostice a epidemiologii invazivního meningokokového onemocnění**

**Jindřichová E.<sup>1,2</sup>, Marešová V.<sup>2</sup>, Kalmusová J.<sup>1</sup>, Křížová P.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy, Státní zdravotní ústav, Praha

<sup>2</sup> 1. infekční klinika Fakultní nemocnice Bulovka, Praha

Invazivní meningokokové onemocnění patří stále mezi závažná, život ohrožující onemocnění s vysokou smrtností. Běžně dostupná diagnostika je založena na kultivačním průkazu *Neisseria meningitidis* či na průkazu patogena mikroskopii nebo latexovou aglutinací.

V Národní referenční laboratoři pro meningokokové nákazy (NRL) byla zavedena PCR diagnostika invazivního meningokokového onemocnění (IMO), která rozšiřuje bezkultivační metody a zvyšuje procento laboratorně potvrzených onemocnění. Umožňuje rychlé určení patogena i o nízké koncentraci přímo z klinického materiálu a vykazuje vyšší specifitu (0,95) a senzitivitu (0,85). Byla vyvinuta seminested a nested PCR metoda, umožňující detekci species *Neisseria meningitidis* a identifikaci seroskupin meningokoků.

V naší studii sledujeme časové možnosti positivity PCR metody v různém klinickém materiálu během prvního týdne onemocnění. Současně jej vyšetřujeme latexovou aglutinací, o které je známo, že nejčastěji zjišťovaný interval trvání positivity likvoru je 2. až 6. den od počátku onemocnění. Klinický materiál (likvor a sérum) odebíráme u pacientů s podezřením na IMO na Infekční klinice Fakultní nemocnice Bulovka od 1. do 7. dne hospitalizace. PCR vyšetření pak provádíme v NRL. Amplifikovaný produkt detekujeme na 2% gelové elektroforéze.

Předností PCR diagnostiky je detekce agens i po zahájení kauzální léčby. Výsledky studie by měly přispět k zpřesnění indikace a interpretace použité metody a porovnat klasické metody detekce *Neisseria meningitidis* s molekulárně genetickými metodami.



## **ABERANTNÍ ANTIGEN KOR-SA 3544 (CD66C) JE REGULOVÁN NA ÚROVNI TRANSKRIPCE**

**Kalina T, Hrušák O**

*CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) – společná pracovní skupina Laboratoře molekulární genetiky II. dětské kliniky a Ústavu imunologie, UK 2.LF*  
školicel O. Hrušák

### **Úvod**

Antigen KOR-SA3544 (Nonspecific cross-reacting antigen-CD66c) byl nalezen na blastech dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL) z prekursorů B buněk (BCP). Tato molekula má velmi těsný vztah ke třem prognosticky významným molekulárně genetickým kategoriím (pozitivita BCR/ABL, hyperdiploidie a negativita TEL/AML1). Navíc byla tato molekula významně častěji nalezena při relapsu. Velmi těsnou korelaci mezi KOR-SA3544 antigenem a genetickými změnami v buňce tak můžeme najít u více než poloviny dětí s ALL. NCA spolu s ostatními molekulami z CEA (carcinoembryonic antigen) rodiny je považován za molekulu regulující adhezi buněk a buněčnou signalizaci. Za normálních podmínek je exprimován v epitelálních buňkách a v hematopoetických buňkách myeloidní řady. V krvetvorné řadě byl prokázán jeho význam pro diferenciaci a pro vyplavování progenitorů z kostní dřeně do periferní krve a v modelu kolorektálního karcinomu jeho přítomnost zvyšovala metastatický potenciál tumoru.

### **Metody**

Metodami RT-PCR stanovujeme mRNA transkript pro NCA. Množství transkriptu kvantifikujeme pomocí Real time PCR systému Light Cycler a jeho expresi vztahujeme k množství house keeping genu pro beta-2-mikroglobulin.

### **Výsledky**

Zhodnotili jsme diagnostické vzorky cDNA u 51 pacientů s ALL. V definovaných prognosticky významných genetických a imunofenotypických skupinách ALL odpovídalo množství transkriptu NCA počtu KOR-SA3544 pozitivních blastů (TEL/AML1  $p=0,0001$ ; BCR/ABL  $p=0,0371$ ; hyperdiploidie  $p=0,047$ ; žádná ze jmenovaných  $p=0,0026$ ).

### **Závěr**

Povrchová exprese CD66c (Nonspecific cross-reacting antigen) je u ALL z B řady regulována na úrovni transkripce.

Podpořeno grantem GAUK 44/2001

## **Expresse genu pro asparagin syntetasu a vztah k citlivosti na L-Asparaginasu u buněk akutních lymfoblastických leukemií**

**Krejčí O.<sup>1,2</sup>, Starková J.<sup>1,2</sup>, Kalinová M.<sup>1,2</sup>, Hrušák O.<sup>1,3</sup>, Madžo J.<sup>1,2</sup>, Starý J.<sup>2</sup> a Trka J.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague (Laboratoř molekulární genetiky)

<sup>2</sup>II. dětská klinika, UK 2.LF a FN Motol

<sup>3</sup>Ústav imunologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha, Česká republika

*školitel: Jan Trka*

L-Asparaginasa (L-Asp) je látka odvozená od bakteriálního enzymu, široce používaná v léčebných protokolech pro terapii akutní lymfoblastické leukemie (ALL) u dětí. Léčebný efekt L-Asp je založen na snížené funkci enzymu asparagin syntetasy (AsnS) v leukemických buňkách. ALL charakterisovaná přítomností fusního genu TEL/AML1 - nejčastější chromosomální aberace dětských ALL - vykazuje signifikantně vyšší citlivost na L-Asp. Aktivita AsnS je z velké části regulována na úrovni exprese genu. Pro sledování exprese genů AsnS a TEL/AML1 jsme navrhli systémy pro kvantifikaci mRNA pomocí kvantitativní PCR v reálném čase, RQ-RT-PCR. Jako referenční gen („house-keeping“) pro eliminaci chyb způsobených nestejným počtem buněk a rozdíly v izolaci mRNA sloužil gen pro  $\beta$ -2-mikroglobulin ( $\beta$ 2M), který vykazuje stabilní expresi. V první části studie jsme se zabývali expresí genu AsnS při diagnóze u skupin dětí s akutní leukemií (n=66) v porovnání s kontrolní skupinou zdravých osob (n=20) a porovnáním jednotlivých subtypů akutní lymfoblastické a akutní myeloidní leukemie při diagnóze. Expresse AsnS u pacientů s akutní leukemií při diagnóze byla signifikantně vyšší než ve skupině zdravých kontrol a paradoxně nejvyšší expresi vykazovala skupina dětí s ALL nesoucí gen TEL/AML1. Při testování hypotézy, že relapsový klon u dětí s ALL může vycházet z buněk resistantních na L-Asp jsme porovnávali expresi AsnS u skupiny dětí s ALL (n=23) při diagnóze onemocnění a při relapsu. Výsledky nepotvrdily hypotézu o rezistenci relapsového klonu na L-Asp způsobené vyšší expresí AsnS. V druhé části jsme se zaměřili na in-vitro studium vlivu L-Asp na buňky nesoucí fusní gen TEL/AML1. Jako model jsme použili buněčnou linii REH, odvozenou od ALL z B lymfocytů nesoucí tento fusní gen. Při podání simulujícím léčebný protokol ALL BFM 95 jsme sledovali růst buněk, indukci apoptosy, rozdělení buněk do jednotlivých fází buněčného cyklu a kvantitativně expresi AsnS a TEL/AML1 genu. Prokázali jsme vliv L-Asp na růst buněk a indukci apoptosy. Podání L-Asp indukovalo expresi AsnS u buněk s fusním genem TEL/AML1, nemělo však vliv na expresi samotného genu TEL/AML1. Z našich pozorování vyplývá, že buňky nesoucí fusní gen TEL/AML1 reagují na podání L-Asp zástavou buněčného dělení a buněčného cyklu, přechodem do apoptosy a zvýšenou expresí genu pro AsnS. Analýza buněčného cyklu naznačuje, že pod vlivem L-Asp dochází k akumulaci TEL/AML1 pozitivních buněk na počátku S fáze.

*Podporováno grantem GAUK 57, IGA MZ 6509 a výzkumným záměrem MŠMT 111300001 a 111300003.*

## **Význam exprese P-glykoproteinu u dětských maligních nádorů**

**Kučerová H., Sumerauer D., Bedrníček J., Eckschlager T.**

Pracoviště: Laboratoř průtokové cytometrie a molekulární biologie, Klinika dětské onkologie UK 2. LF a FN Motol. Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Rezistence na chemoterapii významně ovlivňuje výsledky léčby u různých nádorů. Mnohočetná léková rezistence je v současné době studována u řady lidských nádorů. P-glykoprotein, v CD nomenklatuře zařazen jako CD 243, se uplatňuje jako membránová pumpa při odstraňování různých sloučenin z buňky. P-glykoprotein se exprimuje i na některých normálních tkáních. Jeho overexprese u nádorových buněk vede ke vzniku mnohočetné lékové rezistence a je považována za hlavní mechanismus při rezistenci nádorových buněk na chemoterapeutika. Kvantitativní a funkční analýza P-glykoproteinu je důležitá pro predikci terapeutické odpovědi. Hladina exprese P-glykoproteinu je významný prognostický znak pro zhodnocení úspěšnosti terapie u řady nádorů.

V naší studii jsme stanovovali hladinu exprese P-glykoproteinu u dětských pacientů léčených pro různá nádorová onemocnění na klinice dětské onkologie. Porovnávali jsme hladinu exprese P-glykoproteinu s histologií nádorů, použitou terapií, klinickým stavem pacienta, s výskytem relapsu a metastáz.

Hladinu exprese P-glykoproteinu jsme změřili u 91 pacientů. Nalezli jsme signifikantně vyšší expresi P-glykoproteinu u sarkomů měkkých tkání, neuroblastomů a hepatoblastomů a také u metastazujících nádorů.

Naše data naznačují, že procento buněk exprimujících P-glykoprotein je u některých nádorů významným prognostickým znakem a může mít velký klinický význam.

## MAKROPORÉZNÍ GELY NA BÁZI HEMA URČENÉ K PŘENOSŮM KMENOVÝCH BUNĚK DO NERVOVÉ TKÁŇE

**P. Lesný<sup>1,2</sup>, M. Přádný<sup>3</sup>, J. Fiala<sup>1,2</sup>, E. Syková<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad UK, V úvalu 84, 150 18 Praha 5

<sup>2</sup>Ústav experimentální medicíny ČSAV, Vídeňská 1083; 142 20 Praha 4

<sup>3</sup>Ústav makromolekulární chemie ČSAV, Heyrovského nám. 6, 162 06 Praha 6

Ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie ČSAV jsme připravili řadu makroporézních hydrogelů na bázi kopolymerů 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) s kyselinou methakrylovou. Připravené hydrogely, které jsou určeny k implantaci do centrální nervové tkáně, byly charakterizovány počtem pórů v jednotce objemu, velikostí pórů, obsahem vody v pórech a difúzními parametry. Byla vyjádřena závislost charakterizovaných parametrů na poměru obsahu kyseliny methakrylové a 2-hydroxyethylmethakrylátu v rozmezí 0-20%. Na obsahu kyseliny methakrylové v kopolymeru závisí zejména objem pórů: nejmenší (póry tvoří 20% objemu hydrogelu) je v oblasti kolem 6% kyseliny methakrylové, největší (póry tvoří až 60% objemu hydrogelu) v obou krajních pásmech. Hodnoty objemové frakce volného prostoru hydrogelu ležely mezi 75% a 96%, nebyla prokázána jejich závislost na obsahu kyseliny methakrylové. Struktura hydrogelů byla sledována pomocí konfokálního a elektronového mikroskopu. Zobrazení konfokálním mikroskopem nám umožnilo verifikovat předpokládané velikosti pórů v hydrogelech metodami obrazové analýzy. Široké rozmezí fyzikálních parametrů, které je u připravených hydrogelů možno měnit, spolu s jejich vysokou biokompatibilitou a výhodnými difúzními parametry umožňuje využít hydrogely na bázi HEMA jako médium k přenosům kmenových buněk do centrální nervové tkáně. Pomalejší molekulární odpověď na terapii predikuje špatnou prognosu u TEL/AML1 pozitivních akutních lymfoblastických leukemií: prospektivní real-time kvantitativní (RQ)-RT-PCR studie.

## POMALEJŠÍ MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚĎ NA TERAPII PREDIKUJE ŠPATNOU PROGNOZU U TEL/AML1 POSITIVNÍCH AKUTNÍCH LYMFOBLASTICKÝCH LEUKEMIÍ: PROSPEKTIVNÍ REAL-TIME KVANTITATIVNÍ (RQ)-RT-PCR STUDIE

**Madžo J.<sup>1,2</sup>, Zuna J.<sup>1,2</sup>, Mužíková K.<sup>1,2</sup>, Kalinová M.<sup>1,2</sup>, Krejčí O.<sup>1,2</sup>, Hrušák O.<sup>1,3</sup>, Starý J.<sup>2</sup> a Trka J.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague (Laboratoř molekulární genetiky)

<sup>2</sup>II. dětská klinika, UK 2.LF a FN Motol

<sup>3</sup>Ústav imunologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha, Česká republika

školicel: Jan Trka

TEL/AML1, hybridní gen vycházející z translokace t(12;21)(p13;q22), je nejčastější chromosomální aberací u dětských akutních leukemií (ALL) a je všeobecně asociován s dobrou prognosou. Tento fuzní gen představuje potenciální cíl pro detekci minimální residuální nemoci (MRN) u více než 20% dětských ALL. Real-time kvantitativní RT-PCR (RQ-RT-PCR) se v současné době považuje za nejpřesnější a nejcitlivější metodu kvantifikace MRN. Pomocí RQ-RT-PCR technologie jsme vyšetřili hladiny transkriptu genu TEL/AML1 v průběhu léčby u 57 pacientů s nově diagnostikovanou TEL/AML1 pozitivní ALL. Hladina transkriptu genu TEL/AML1 byla normalisována porovnáním s expresí genu pro  $\beta$ -2-mikroglobulin ( $\beta$ 2M), který byl zvolen jako interní referenční gen pro kompenzaci variací kvality cDNA. V *in vitro* experimentu na modelu buněčné linie REH nesoucí translokaci t(12;21) jsme ověřili, že exprese TEL/AML1 genu v buňkách je konstantní a není ovlivněna cytostatickou terapií (např. L-Asparaginasou). Hladina transkriptu TEL/AML1 ve vzorku tedy přímo odpovídá počtu TEL/AML1-positivních buněk a určuje tak hladinu MRN. Na konci indukční léčby v den+33, nejdůležitějším bodě pro predikci úspěšnosti terapie, bylo 75 % pacientů MRN negativních, 13 % dosáhlo hladinu  $< 10(-4)$  a ostatních 13 % mělo pozitivitu na hladině  $10(-4) - 10(-2)$ . Žádný TEL/AML1 pozitivní pacient neměl v tomto časovém bodě hladinu vyšší než  $10(-2)$ . Získaná data jsme srovnali se studií, která využívala detekce MRN pomocí přestaveb imunoreceptorových genů u neselektované skupiny pediatrických ALL (van Dongen et al; Lancet 1998). Toto srovnání demonstruje, že majoritní skupina TEL/AML1-positivních pacientů vykazuje v době indukční terapie signifikantně rychlejší redukci MRN v den+33 ve srovnání s celou skupinou ALL ( $p=0,0001$ ). Tři z vyšetřených pacientů zatím dospěli k relapsu a všichni patří do skupiny s pozitivní hladinou MRN v den+33 (distribuce relapsů je vysoce signifikantní:  $p=0,0048$ ). U dvou pacientů byla MRN na hladině  $10(-4) - 10(-2)$  a u jednoho na hladině  $< 10(-4)$ . Lze tedy konstatovat, že přestože TEL/AML1 pozitivní leukemie mají celkově příznivější prognosu, MRN pozitivita na konci indukční terapie kvantifikovaná pomocí RQ-RT-PCR, identifikuje pacienty s rizikem relapsu. Poprvé tak prokazujeme, že kvantitativní sledování exprese genu TEL/AML1 v průběhu léčby má prognostický význam.

Podporováno grantem IGA MZ 6509, 301/P055 GAČR a výzkumným záměrem MŠMT 111300001 a 111300003.

## **VYŠETRENIE MIKRODELÉCIÍ U ČESKÝCH MUŽOV S PORUCHOU REPRODUKČIE**

M.Machatková, M.Matějčková, Š.Vilímová, I.Smetanová, A.Krebsová,  
M.Macek Sr.

**Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, Praha**

Školitel: Doc.MUDr.Milan Macek, CSc.

Mikrodelécie Y patria k častým genetickým príčinám mužskej infertility. U 197 českých mužov s ťažkou poruchou reprodukcie, charakterizovanou abnormálnym spermioqramom, sme vyšetřili mikrodelécie chromozómu Y. Mužov sme rozdelili podľa spermioqramu do štyroch skupín. Na stanovenie mikrodelécií chromozómu Y sme použili multiplexné PCR s amplifikáciou šiestich STS markerov pre AZF oblasť (sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255) a dvoch génov krátkeho ramienka chromozómu Y (ZFY a SRY). Mikrodelécie chromozómu Y sme našli u 8/197 (4,1%) vyšetřených, z toho 7/64 (10,9%) u mužov s azoospermioiu a 1/20 (5,0%) u mužov s ťažkou oligospermioiu. Výskyt mikrodelécií chromozómu Y sa u českých mužov s poruchou reprodukcie nelíši od dosiaľ uverejnených frekvencií.

# NEGENETICKÉ VLIVY V ETIOPATOGENEZI DIABETES MELLITUS 1. TYPU U DĚTÍ V ČR

(Vliv pořadí narození, věku matky při porodu dítěte a vzdělání matky na riziko diabetu 1 typu u dítěte)

**H. Malcová<sup>1,2</sup>, Z. Šumník<sup>1</sup>, P. Dřevínek<sup>1</sup>, V. Lánská<sup>3</sup>, S. Koloušková<sup>1</sup>, M. Šnajderová<sup>1</sup>, J. Vavřínek<sup>1</sup>, O. Cínek<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> 2.dětská klinika 2.LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup> Centrum preventivního lékařství 3.LF UK, Praha

<sup>3</sup> Oddělení biostatistiky, IKEM Praha

školitel: Doc.MUDr.J.Vavřínek, CSc.; Doc.MUDr.H.Provazníková, CSc.

Cíl: Na etiologii diabetes mellitus 1.typu (DM 1) se přibližně stejnou měrou podílejí genetické i negenetické faktory. I když se působení vlivů zevního prostředí zdá nezpochybnitelné, výsledky studií zabývajících se tímto problémem jsou nejednoznačné a vedou často k rozdílným závěrům. Cílem naší práce bylo posoudit podíl některých faktorů na riziku onemocnění DM 1 u dětí.

Soubor a metodika: Pomocí strukturovaného dotazníku jsme prostřednictvím ošetřujících diabetologů z 51 center oslovili 1143 rodičů diabetických dětí, u nichž byl DM 1 diagnostikován v letech 1993-2000 (data byla získána prostřednictvím Registru dětského diabetu ČR). Validní údaje jsme obdrželi od 878 dětí, tím bylo dosaženo 77% návratnosti. Kontroly jsme vybrali z anonymizovaných záznamů Českého statistického úřadu (zprostředkovaných Ústavem zdravotnických informací a statistiky) tak, aby na každý případ připadlo 50 náhodně vybraných kontrol shodného roku narození. Vzhledem k tomu, že data kontrol nejsou v elektronické podobě k dispozici z období před rokem 1986, do zpracování bylo zahrnuto 647 případů narozených 1986-1999 a 32 500 kontrol. Hodnotili jsme vzdělání rodičů, věk rodičů při narození dítěte, pořadí narození dítěte, jeho porodní délku a hmotnost. Údaje byly zpracovány pomocí logistické regrese.

Výsledky: Z analýzy získaných dat vyplývá vyšší riziko diabetu při vyšším věku matky při porodu dítěte ( $p < 10^{-4}$ ) a nižším pořadí narození dítěte ( $p < 10^{-4}$ ), u pořadí je tento efekt nezávislý na věku matky. Vyšší vzdělání matky působí protektivně i po korekci na věk matky. Vyšší věk otce při narození dítěte je slabě rizikový. Signifikantní vliv na riziko diabetu nebyl prokázán u porodní délky ani hmotnosti.

Diskuse a závěr: Studie ukázala asociaci některých negenetických vlivů (pořadí narození dítěte, věk rodičů při narození a vzdělání matky) s rizikem diabetu 1. typu v české dětské populaci. Dostatečná návratnost případů a náhodný výběr velkého souboru kontrol z registru narozených umožnily citlivou detekci zkoumaných faktorů. Pozorované jevy jsou nejpravděpodobněji druhotným odrazem expozice infekčním či výživovým vlivům v raném dětství.

*Studie byla podpořena Českou diabetologickou společností, grantem FRVŠ 1758 a výzkumným záměry MZ 000 6042 a MŠMT 111 300 003. Za poskytnutá data děkujeme Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR.*

# HISTOLOGICKÉ A BIOMECHANICKÉ ZMĚNY CHRUPAVKY PO DLOUHODOBÉ LÉČBĚ CHONDROITINSULFÁTEM.

**Trč T., Dylevský I., Mašát P.**

Ortopedická klinika dětí a dospělých UK 2.LF a FN Motol  
Pracoviště funkční anatomie UK 2.LF a FTVS

Školitel: Prof.MUDr.I.Dylevský,DrSc. ,Doc.MUDr.T.Trč,CSc.

V naší práci se zabýváme účinky perorálně podávaného chondroitinsulfátu v podobě přípravku Condrosulf pacientům s osteoartrózou. Tato studie probíhá již třetí rok a v současné době získáváme první výsledky histologického zhodnocení chrupavky po této léčbě. Studie je dvojitě slepá, kontrolovaná placebem, aplikované dávky léčby jsou dodány výrobcem slepě s placebem. Teprve po skončení pokusu je otevřena informace, který pacient byl léčen aktivní substancí, a který placebem.

Tato studie probíhá ve dvou fázích. U pacientů s osteoartrózou provádíme arthroscopicky odběr chrupavky, po roční léčbě je proveden další následný odběr. Samozřejmě jsou do této studie zařazeni ti pacienti, u kterých nebylo možno provést definitivní ošetření v jedné době. Souběžně probíhá odběr dvojice kadaverozních vzorků chrupavky identickou kanylou ze zátěžové plochy kondylu femuru a následně je provedeno biomechanické zhodnocení vlastností chrupavky a její histologická odezva na toto vyšetření. V druhé fázi studie rozšíříme histologické vyšetření chrupavky u pacientů s OA před a po léčbě o biomechanický rozbor vlastností chrupavky a pokusíme se objektivně zhodnotit účinek chondroitinsulfátu jak na histologickou stavbu chrupavky, tak na biomechanické vlastnosti této tkáně po roční terapii tímto preparátem.

Chondroprotektivní efekt látek je diskutován, jejich účinek není zatím jednoznačně prokázán. Z dosavadního průběhu studie je v histologických nálezech velmi obtížné diferencovat výrazné změny, každopádně není patrná progresivní stávající změny. Pro potvrzení skutečného zlepšení funkce kloubní chrupavky jsou však důležité nejen změny v morfológické stavbě tkáně, ale, a to především, změny jejích mechanických vlastností. Tato měření poskytující informaci o případných zlepšení v odolávání chrupavky statické i dynamické zátěži však teprve proběhnou ve spolupráci s fakultou strojní při ČVUT.



# HISTOLOGICKÉ A BIOMECHANICKÉ ZMĚNY CHRUPAVKY PO DLOUHODOBÉ LÉČBĚ CHONDROITINSULFÁTEM.

**Trč T., Dylevský I., Mašát P.**

Ortopedická klinika dětí a dospělých UK 2.LF a FN Motol  
Pracoviště funkční anatomie UK 2.LF a FTVS

Školitel: Prof.MUDr.I.Dylevský,DrSc. ,Doc.MUDr.T.Trč,CSc.

V naší práci se zabýváme účinky perorálně podávaného chondroitinsulfátu v podobě přípravku Condrosulf pacientům s osteoartrózou. Tato studie probíhá již třetí rok a v současné době získáváme první výsledky histologického zhodnocení chrupavky po této léčbě. Studie je dvojitě slepá, kontrolovaná placebem, aplikované dávky léčby jsou dodány výrobcem slepě s placebem. Teprve po skončení pokusu je otevřena informace, který pacient byl léčen aktivní substancí, a který placebem.

Tato studie probíhá ve dvou fázích. U pacientů s osteoartrózou provádíme arthroscopicky odběr chrupavky, po roční léčbě je proveden další následný odběr. Samozřejmě jsou do této studie zařazeni ti pacienti, u kterých nebylo možno provést definitivní ošetření v jedné době. Souběžně probíhá odběr dvojice kadaverozních vzorků chrupavky identickou kanylou ze zátěžové plochy kondylu femuru a následně je provedeno biomechanické zhodnocení vlastností chrupavky a její histologická odezva na toto vyšetření. V druhé fázi studie rozšíříme histologické vyšetření chrupavky u pacientů s OA před a po léčbě o biomechanický rozbor vlastností chrupavky a pokusíme se objektivně zhodnotit účinek chondroitinsulfátu jak na histologickou stavbu chrupavky, tak na biomechanické vlastnosti této tkáně po roční terapii tímto preparátem.

Chondroprotektivní efekt látek je diskutován, jejich účinek není zatím jednoznačně prokázán. Z dosavadního průběhu studie je v histologických nálezech velmi obtížné diferencovat výrazné změny, každopádně není patrná progresivní stávajících změn. Pro potvrzení skutečného zlepšení funkce kloubní chrupavky jsou však důležité nejen změny v morfológické stavbě tkáně, ale, a to především, změny jejích mechanických vlastností. Tato měření poskytující informaci o případných zlepšení v odolávání chrupavky statické i dynamické zátěži však teprve proběhnou ve spolupráci s fakultou strojní při ČVUT.

## **ČETNOST MUTACÍ FV-LEIDEN, FII-20210G->A A MTHFR 677C->T GENŮ U PACIENTEK S TĚŽKÝMI PATOLOGIEMI V TĚHOTENSTVÍ – PREEKLAMPSIÍ, INTRAUTERINNÍ RŮSTOVOU RETARDACÍ PLODU A PORODEM MRTVÉHO PLODU V POROVNÁNÍ S NÁHODNOU KONTROLNÍ POPULACÍ.**

**Emilie Mikešová<sup>1</sup>, Eva Hladíková<sup>1</sup>, Ivana Hadačová<sup>2</sup>, Šárka Vilímová<sup>1</sup>, Ivana Špálová<sup>3</sup>, Monika Koudová<sup>1</sup>, Michaela Hejtmánková<sup>5</sup>, Marie Hladíková<sup>4</sup>, Milan Macek<sup>1</sup>, Milan Macek Jr.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centrum pro diagnostiku a léčbu cystické fibrózy Ústav biologie a lékařské genetiky, <sup>2</sup>Odd. klinické hematologie, <sup>3</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, <sup>4</sup>Ústav lékařské informatiky; všichni Univerzita Karlova v Praze a Fakultní nemocnice v Motole, Praha; <sup>5</sup>Gennet s r.o. Praha  
Školitel: Doc. MUDr. M. Macek jr. DrSc.

Úvod. Preeklampsie (PE), intrauterinní růstová retardace plodu (IUGR) a intrauterinní úmrtí plodu / porod mrtvého plodu patří v gynekologii a porodnictví k závažným patologiím s vysokou prevalencí (1-5%) a nejasnou patogenezi. Vzhledem k některým společným rysům, jako je například porucha uteroplacentární perfuze na podkladě trombózy placentárních cév, se uvedené komplikace často vyskytují společně a/nebo se navzájem překrývají. Hereditární trombofilie v podobě přítomnosti „Leidenské“ mutace (FV-L) je proto jednou z možných příčin, a to i přestože uvedené komplikace mají multifaktoriální patogenezi. Molekulárně genetické vyšetření „trombofilních“ mutací u nosiček rizikových alel zajistí optimální primární prevenci a léčbu těchto komplikací, včetně prevence jejich rekurence cílenou léčbou.

Cíl studie. Stanovit vliv hereditární trombofilie na vznik preeklampsie, intrauterinní růstové retardace plodu a intrauterinního úmrtí plodu.

Soubor a metody. Provádíme „case-control“ studie spočívající v PCR amplifikaci a restriční analýze mutací FV-L, FII 20210G->A a 677C->T MTHFR genů. Celkem bylo dosud vyšetřeno 23 pacientek (46 alel) s anamnézou porodu mrtvého plodu, 10 pacientek (20 alel) s preeklampsií a 13 pacientek (26 alel) s IUGR. Uvedené soubory se navzájem z části překrývají, vzhledem k společnému výskytu uvedených patologií. Pro relevantní statistické zhodnocení (Fisher exact test) byly soubory sloučeny. Ke stanovení patogenetické asociace nalezených četností vyšetřovaných alel jsme použili 218 jedinců z české náhodné kontrolní populace v reprodukčním věku (věkové rozmezí 18-45 let).

Výsledky. Kontroly: FV-L (25/436 alel-5.7%), F-II (3/130-2.3%), MTHFR 677C->T (74/198-37.4%). Porod mrtvého plodu: FV-L (5/46-10.8%), F-II (0/46-0.0%) a MTHFR 677C->T (13/44-29.5%). PE: FV-L (2/20-10%), F-II (0/20-0.0%) a MTHFR 677C->T (5/20-25.0%). IUGR: FV-L (3/26-11.5%), F-II (1/26-3.8%) a MTHFR 677C->T (12/26-46.2%). Po sloučení: FV-L (8/74-10.8%), F-II (1/74-1.4%) a MTHFR 677C->T (23/74-31.1%).

Souhrn: U žádné z těchto závažných těhotenských komplikací jednotlivě, ani po sloučení souborů jsme nenalezli statisticky významné rozdíly oproti kontrolní populaci v distribuci uvedených „trombofilních“ alel. Přesto můžeme zatím poukázat až na 2x zvýšenou četnost mutace FV-L u těchto pacientek a tak možnou patogenetickou asociaci. Je proto nutné navýšit počty vyšetřených pacientek a poté opět zhodnotit tento potenciálně důležitý trend.

Podpořeno granty: NM 6250-3, 00000064203 od IGA MZ ČR a VZ 111300003, LN00A079 od MŠMT ČR.

## VLIV NEUROTICISMU NA SUBJEKTIVNÍ VNÍMÁNÍ TĚLESNÉ ZÁTĚŽE U PACIENTŮ S BETA-BLOKÁTOREM

**Mgr. Klára Mocková, Doc. MUDr. Jiří Radvanský, CSc.**

pracoviště: Klinika tělovýchovného lékařství

školitel: Doc. MUDr. Jiří Radvanský, CSc.

Cílem našeho sledování bylo zjištění, zda existuje vztah mezi neuroticismem, jako psychologickým faktorem, a subjektivním vnímáním tělesné zátěže u pacientů s kardiovaskulární chorobou, kteří jsou léčeni beta-blokátory sympatiku. Právě u těchto pacientů je subjektivní vnímání intenzity zátěže považováno za důležitý alternativní parametr k srdeční frekvenci, jejíž hladina je ovlivněna farmakoterapií.

V našem experimentu jsme provedli zátěžový test na bicyklovém ergometru, který obsahoval 3 stupně submaximální zátěže v rovnovážném stavu (na úrovni  $0,5 \text{ W.kg}^{-1}$ ,  $1 \text{ W.kg}^{-1}$  a  $1,5 \text{ W.kg}^{-1}$ ) a krátký kontinuální test do maxima. Tímto způsobem jsme vyšetřili 34 pacientů (19 žen a 15 mužů) s ICHS nebo hypertenzí, léčených některým ze selektivních beta-blokátorů sympatiku (věk =  $60,71 \pm 8,68$ , BMI =  $28,58 \pm 4,38$ ,  $\text{VO}_2\text{max} = 21,7 \pm 4,13$ ). Subjektivní vnímání zátěže bylo měřeno škálou RPE (Rating of Perceived Exertion). Míra neuroticismu pacientů byla zjišťována pomocí Eysenckova osobnostního dotazníku.

Vztah mezi neuroticismem a vnímáním zátěže byl sledován na jednotlivých stupních rovnovážné zátěže pro celou skupinu dohromady a odděleně pro muže a ženy. Pro celou skupinu byl, po vyloučení vlivu aerobní zdatnosti, prokázán významný ( $p < 0,05$ ) vztah mezi těmito parametry pouze na intenzitě odpovídající  $1,5 \text{ W.kg}^{-1}$  ( $r = 0,42$ ). Po rozdělení skupiny podle pohlaví se tento vztah ukázal být významným pouze u skupiny žen, a to na úrovni  $1 \text{ W.kg}^{-1}$  ( $r = 0,63$ ) a  $1,5 \text{ W.kg}^{-1}$  ( $r = 0,64$ ) s  $p < 0,01$ . Na těchto intenzitách byl zároveň zjištěn statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami RPE u skupiny emočně více stabilních a emočně více labilních jedinců. U žen lze tedy konstatovat, že s mírou neuroticismu roste míra subjektivního vnímání intenzity zátěže. U mužů tento vztah mezi sledovanými parametry prokázán nebyl.

Výsledky ukazují na velkou ovlivnitelnost vnímání zátěže psychologickými faktory jako je např. neuroticismus zvláště u pacientek s kardiovaskulárními chorobami léčených beta-blokátory. To může mít důsledky v klinické praxi jak zátěžového vyšetřování, tak pohybové terapie.

## **FUNKČNÍ A STRUKTURÁLNÍ ZMĚNY HIPPOKAMPU U POTKANA PO BILATERÁLNÍM OZÁŘENÍ LEKSELLOVÝM GAMA NOŽEM**

**K. Náměstková<sup>1,3</sup>, R. Liščák<sup>5</sup>, G. Brožek<sup>2</sup>, V. Mareš<sup>4</sup>, I. Hájek, D. Jirák, M. Burian, V. Herynek<sup>6</sup>, E. Syková<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Ústav neurověd UK 2.LF, <sup>2</sup>Ústav Fysiologie UK 2.LF, <sup>3</sup>Oddělení neurověd Ústav Experimentální Medicíny AVČR, <sup>4</sup>Fysiologický ústav AVČR, <sup>5</sup>Oddělení stereotaktické a radiační neurochirurgie Nemocnice Na Homolce, <sup>6</sup>Pracoviště Experimentální NMR IKEM

Ablace epileptického ložiska v hippocampu nekrotizující dávkou gama záření u pacientů s farmakoresistentní mesiotemporální epilepsií (MTLE) je alternativou epileptochirurgického zákroku. Na potkaním modelu MTLE již subnekrotická dávka účinně snižovala množství epileptických záchvatů. Sledovali jsme zda aplikace subnekrotických dávek na oblast obou dorzálních hippocampů u potkana působí také poškození funkce prostorové paměti. Ozáření epileptických ložisek v hippocampech, by mohlo být přípustnou terapií pacientů s bilaterální MTLE. Dospělí potkani kmene Long-Evans byli ozářeni tak, že 70% isodosa pokrývala oblast dorsálního hippocampu. Jednotlivé skupiny, ozářené dávkami 25, 50, 75, 100 a 150 Gy, pak byly testovány v Morrisově vodním bludišti v intervalech 1, 3, 6 a 12 měsíců od ozáření, opakovaně byly vyšetřeny na experimentálním NMR, a následně byly mozky zvířat histologicky zpracovány. Testování ve vodním bludišti prokázalo poruchu učení u skupiny ozářené 150 Gy již po 1 měsíci a histologicky byl patrná nekróza v oblasti 90% isodosy. Zvířata ozářena 75 Gy, vykazovala poruchu učení teprve po 6 měsících, která byla doprovázena výskytem léze na MRI i na histologických řezech. U těchto zvířat přetrvávala porucha učení ve vodním bludišti i po 12 měsících a našli jsme i přetrvávající strukturální změny. Naše výsledky ukazují, že teprve po 6-12 měsících dochází k rozsáhlejšímu poškození oblasti, která byla ozářena dávkou vyšší než 50 Gy, což se projeví poruchou učení sledovatelnou námi použitým testem.

## **PŘÍPAD TRANSLOKACE CHROMOZOMŮ 15 A 21 A JEHO VYŠETŘENÍ METODOU FISH**

**Novotná K., Hrabáková J., Novotná D., Malíková, M.**

Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2.LF a FNŠP v Motole, Praha

Školitel: RNDr. E. Kočárek, PhD.

Prezentujeme případ 2 letého slepého, hluchého a němého chlapce s kryptoorchismem. Běžným cytogenetickým vyšetřením byl zjištěn abnormální karyotyp obsahující derivovaný chromozom 21: 45,XY,der(21), t(15;21)(q13;q22.3), - 15. Cytogenetický nálezn byl potvrzen metodou FISH s využitím centromerických a lokus specifických sond (od firem Vysis a Cytocell): 45,XY,der(21), t(15;21) (q13;q22.3), - 15 . ish der(21) (D13Z1/D21Z1+, D15Z1-, SNRPN-, UBE3A/D15S10-, D21S270/D21S337/21S55/D21S233+, PML+). Tyto výsledky dokumentují haploinsuficienci kritického regionu pro syndromy Prader-Willi/Angelman na 15q11-q13. V příspěvku současně upozorňujeme na možnosti molekulárně cytogenetické diagnostiky (FISH) dalších strukturních aberací chromozomu 15, zejména syndromů Prader-Willi a Angelman (mikrodelece 15q11-q13) a marker chromozomů vzniklých rozsáhlými přestavbami 15.chromozomu. Diskutujeme vztahy mezi výsledky molekulárně cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření a možnosti jejich interpretace. Naše práce byla podpořena granty FRVŠ 2482/2002 G3 (Fond rozvoje vysokých škol), IGA NE6912-4 (Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví České republiky) a výzkumným záměrem Karlovy Univerzity č.111300003.

## Host-range protein C7L viru vakcinie

Otáhal P., Šroller V., Němečková Š.

Oddělení experimentální virologie, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha.

Virus vakcinie, člen rodiny poxvirů, je schopen replikace v širokém spektru buněk savčího původu. V genomu poxvirů bylo identifikováno několik genů, jejichž produkty jsou esenciální pro množení viru v určitých buněčných liniích a proto jsou označovány jako host-range geny. Geny C7L a K1L VV patří do této skupiny genů a byl vysloven předpoklad, že proteiny C7L a K1L mohou bránit rozvoji apoptózy v infikovaných buňkách a tím zvýšit permisivitu buněk pro virus. Naším cílem bylo zjistit, zdali oba tyto geny působí skutečně antiapoptoticky a pokud ano, tak jakým mechanismem.

Nejprve jsme zkoumali schopnost replikace delečních mutantů  $\Delta$ C7L,  $\Delta$ K1L,  $\Delta$ C7L $\Delta$ K1L na opičích buňkách CV-1 a krysích buňkách RAT-1. Zjistili jsme, že současná delece C7L a K1L genu výrazně omezí replikaci mutovaného viru na buňkách CV-1 a u krysích buněk RAT-1 infekce navodí apoptózu. Virus s delecí pouze C7L má plně zachovanou schopnost replikace na buňkách CV-1 avšak infekce navodí apoptózu na buňkách RAT-1. Schopnost replikace na buňkách RAT-1 je podmíněna přítomností C7L genu. Abychom mohli detekovat C7L protein monoklonální protilátkou, zkonstruovali jsme C7L s epitopem FLAG připojeným na N-konci. Tento řízní gen jsme vložili pod kontrolou vakciniového promotoru P7,5 do virové thymidinkinázy. Jako rodičovské viry jsme použili deleční mutanty  $\Delta$ C7L a  $\Delta$ C7L $\Delta$ K1L. Izolovali jsme klon  $\Delta$ C7L $\Delta$ K1L-C7LFLAG, který měl obnovenou schopnost replikace na buňkách RAT-1 a prostřednictvím monoklonální protilátky anti-FLAG jsme na western-blotu prokázali expresi C7LFLAG. Subcelulární frakcionací jsme zjistili, že C7LFLAG je obsažen hlavně v nukleární a těžké membránové frakci zatímco v cytoplazmatické a lehké membránové frakci je obsažen méně. Pomocí konfokální mikroskopie jsme zjistili, že C7LFLAG lokalizuje do jádra a lze ho detekovat již za 7 h po infekci. K jaderné lokalizaci dochází i v přítomnosti cytosin-arabinosidu, což dokládá nezávislost jaderné lokalizace C7LFLAG na replikaci virové DNA. Pro určení možných molekulárních interakcí C7LFLAG jsme provedli radio-imunoprecipitační experiment a našli jsme band o velikosti cca 150 kD specificky koprecipitující anti-FLAG protilátkou.

Doufáme, že v dalších experimentech se nám podaří identifikovat interagující protein a tím odhalit mechanismus působení C7L proteinu.

# Využití informačních technologií VE ZPRACOVÁNÍ A ARCHIVACI DAT A VE VÝUCE

**Autor:** Ing. Martin Pánek

**Pracoviště:** Ústav biologie a lékařské genetiky, UK 2.LF  
Ústav počítačové a řídicí techniky, VŠCHT Praha

**Vedoucí práce:** RNDr. Eduard Kočárek, PhD.

Rozvoj informačních technologií, databázových systémů a počítačových sítí zasáhl do všech odvětví průmyslu i vzdělávací sféry. Medicínské obory bychom těžko řadili do některé z těchto kategorií. Nicméně využití moderních technologií přímo vybízí, při objemu informací, který v tomto oboru je, zefektivnit práci lékařů na jedné straně a laborantů na straně druhé. Stejně tak usnadnit spolupráci nejen mezi jedním pracovištěm a jednou konkrétní laboratoří, ale i mezi jednotlivými lékařskými obory.

Příspěvek je zaměřen na využití počítačových databází pro shromažďování a archivaci veškerých dat o pacientech. Ve spojení s celosvětově dostupnou sítí internet je možné snadné ovládání takové databáze a je usnadněna komunikace popř. konzultace s jinými pracovišti v daném oboru. Systém je navržen pro komunikaci mezi lékaři v genetických poradnách a molekulárně cytogenetickou laboratoří, umístěnou mimo areál FN Motol. Celý systém nemá sloužit jen k okamžité komunikaci mezi pracovišti, ale také k archivaci všech uložených dat a vyhledávání podobných kazuistik. Výsledkem by měl být přehledně a velmi rychle podaný komplexní pohled na pacienta. Takto uložená data jsou k dispozici 24 hodin denně, 7 dní v týdnu. Celý systém v budoucnu počítá s možností zpracování obrazů získaných v naší laboratoři. Jedná se jak o uložení obrazů do databáze, tak o odstranění rušivých složek a částečně automatické vyhledání zajímavých informací, na které by se měl lékař zaměřit. Veškeré informace jsou v témže okamžiku přístupny všem zúčastněným stranám, které mají možnost si informace vytisknout a založit v klasické podobě ke kartě pacienta.

Systém je rozdělen na část pro lékaře a pracovníky laboratoře a na část s obecnými informacemi o jednotlivých metodách, kde budou postupně uváděny novinky v této oblasti. Tato část systému má sloužit k předávání informací našim studentům a všem zájemcům o tuto problematiku. Systém není uzavřený a je možno jej rozšiřovat podle zájmu dalších pracovišť. Věříme, že námi takto zavedená inovace pomůže k rychlejší diagnostice různých onemocnění.

## VÝTĚŽNOST DRUHOTRIMESTROVÉHO BIOCHEMICKÉHO VYŠETŘENÍ TĚHOTNÝCH ŽEN

**SIMANDLOVÁ M., VEJVALKOVÁ Š., HAVLOVICOVÁ M., SEEMANOVÁ E.  
ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY FNMOTOL A 2.LF UK.**

Principem biochemického druhotrimestrového screeningu těhotných žen je zhodnocení hladiny AFP, uE3 ( příp. SP1) a hCG v mateřském séru. Hodnoty mimo stanovené rozmezí mohou upozornit na postižení plodu chromozomální aberací nebo rozštěpovou vadou. Cílem projektu je upřesnit informace o výsledcích těhotenství, která byla pro pozitivní screening indikována k prenatální diagnostice a chromozomální, event. rozštěpová vada nebyla zjištěna. Práce by měla odpovědět na otázku, zda abnormální hodnoty těhotenského screeningu mohou signalizovat upozornit na riziko jiné vývojové vady plodu, a s jakou spolehlivostí záchytu.

Vyšetřili jsme 253 dětí s matkami z 1. skupiny ( matky sledované pro pozitivní screening) a 183 dětí s matkami z 2. skupiny (matky sledované pro vyšší věk, než 35 let.) . U každého dítěte jsme rozebrali anamnestická data, přítomnost vrozených vývojových vad a přítomnost onemocnění s převážně získanou složkou .Dále jsme se zaměřili na eventuelní maladaptaci dítěte v kolektivu. Maminek jsme se ptali na míru stresu během čekání na výsledek karyotypizace plodu , jejich náhled na eventuelní ukončení těhotenství v případě patologického karyotypu a názor na vhodnost genetického vyšetřování během těhotenství. Statisticky významný byl rozdíl v dobré či špatné adaptaci na kolektiv. (Lze pouze spekulovat o vlivu maternálního stresu na plod). Statisticky vysoce významný byl rozdíl v míře stresu pociťovaném ženami z 1. a 2. skupiny ( stupnice 0-6, 0 žádný 1 velice slabý 2 slabý 3 střední 4 silný 5 velice silný 6 nesnesitelný),  $p < 0,0005$  , mediánem 1. skupiny byl stupeň 4, mediánem 2. skupiny byl stupeň 3. Další statisticky významný rozdíl byl v náhledu žen na event. přerušení těhotenství v případě chromozomální abnormity plodu, a v názorech na správnost či nesprávnost genetického vyšetřování těhotných

Z naší studie vyplývá významná emocionální zátěž žen s pozitivním druhotrimestrálním screeningovým vyšetřením z mateřského séra. Lze pouze spekulovat o možném vlivu maternálního stresu na pozdější problémy s adaptací dítěte v kolektivu . Námi konzultované ženy vítají vydání informačního letáku o screeningu Downova syndromu. Ke zlepšení péče o těhotné přispěje jistě i stávající tendence týkající se posunu screeningových vyšetření do prvního trimestru.



## **IDENTIFIKACE PŮVODU MARKER CHROMOZOMŮ METODOU FISH - VYBRANÉ KAZUISTIKY**

**Strnad M., Novotná D., Novotná K., Kočárek E.**

Pracoviště: Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2.LF a FNsP v Motole,  
Praha

Vedoucí práce: RNDr. E. Kočárek, PhD.

Identifikace marker chromozomů je zajímavým diagnostickým problémem molekulární cytogenetiky. Prezentujeme náš soubor 19 pacientů s diagnostikovanými marker chromozomy a výsledky jejich vyšetření metodou FISH s využitím centromerických a lokus specifických sond. Mezi popsányi případy převažují marker chromozomy vzniklé rozsáhlými delecemi akrocentrických chromozomů (celkem 8 případů). V kazuistické části uvádíme případ pacientky, u jejíhož potraceného plodu byl zjištěn karyotyp 47, XX, + mar. Metodou FISH jsme zjistili, že marker chromozom obsahuje centromeru chromozomu 21 a část krátkých ramének chromozomu 5. Tento závěr zčásti potvrzuje i vyšetření metodou SKY, kterým se však nepodařilo identifikovat centromerickou oblast chromozomu 21. Výsledek ukazuje nejen neobvyklý nález dysmorfického chromozomu, ale dokumentuje také nutnost vyšetření markerů s využitím různých molekulárně cytogenetických metodických přístupů (SKY, klasická FISH s lokus specifickými, resp. centromerickými sondami). Naše práce byla podpořena granty FRVŠ 2482/2002 G3 (Fond rozvoje vysokých škol), IGA NE6912-4 (Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví České republiky) a výzkumným záměrem Karlovy Univerzity č.111300003.

## **DETEKCE AMPLIFIKACE AML1 GENU U DĚTÍ S AKUTNÍ LYMFOLASTICKOU LEUKEMIÍ POMOCÍ REAL-TIME KVANTITATIVNÍ (RQ-)PCR**

**Šrámková L., Kalinová M., Mužíková K. a Trka J.**

*CLIP- Childhood Leukaemia Investigation Prague (Laboratoř molekulární genetiky)  
II. dětská klinika, UK 2.LF a FN Motol, Praha, Česká republika*

*školitel: Jan Trka*

AML1 je gen zásadně důležitý pro hematopoesu, je součástí několika chromosomálních translokací asociovaných s akutními leukemiemi vycházejících jak z myeloidní, tak z lymfatické řady (např. TEL/AML1, AML1/ETO). Gen AML1 se nachází na chromosomu 21 a u jedinců s morbus Down (trisomie chromosomu 21) se předpokládá, že amplifikace AML1 genu je jednou z pravděpodobných příčin jejich významně vyššího rizika vzniku akutní leukemie. U dětských pacientů s hyperdiploidní akutní lymfoblastickou leukemií (ALL) je trisomie a tetrasomie chromosomu 21 jedním z nejčastějších klonálních nálezů. V posledních letech se objevují cytogenetické práce metodou FISH, které dokládají též amplifikace AML1 genu u dětí s ALL bez nadpočetného chromosomu 21. Pomocí RQ-PCR technologie na přístroji ABI 7700 (TaqMan) jsme vyšetřili 77 diagnostických vzorků genomické (g)DNA izolované z kostní dřeně. Standardní křivka byla konstruována pomocí ředění buffy-coatové DNA na 10, 3, 1, 0.3 a 0.1%. Kvantifikace AML1 genu byla normalisována porovnáním s kvantifikací genu pro albumin, aby se kompensovaly možné rozdíly v množství a kvalitě izolované gDNA. Všechny vzorky byly vyšetřovány minimálně v triplikátech. Jako kontrolu jsme použili periferní krve či kultury fibroblastů 6 pacientů s m. Down a 6 vzorků pacientů s nehematologickými onemocněními či zdravých kontrol. Výsledky vyjadřujeme jako poměr detekovaných kopií genu AML1 k detekovaným kopiím genu pro albumin. Předpokládali jsme, že u zdravých kontrol bude tento poměr 1.0, u pacientů s m. Down 1.5 (3 kopie AML1 vs. 2 kopie albumin) a že tedy u diagnostických vzorků dětí s ALL budeme schopni odlišit případné amplifikace AML1 genu. Výsledky jsme porovnali s výsledky cytogenetických vyšetření kostní dřeně, byly též korelovány s přítomností významných fúzních genů a imunofenotypem blastů. Výsledky vyšetření zdravých kontrol ukázaly poměr AML1/albumin 0.84-1.08 (median 0.97), u pacientů s m. Down byl tento poměr roven 0.97-1.74 (median 1.55), přičemž nejnižší hodnota náleží pacientovi s prokázaným mozaicismem trisomie 21. Pacienty jsme rozdělili do 2 skupin dle poměru AML1/albuminu: 1. děti s amplifikací AML1 při dg. (hodnoty nad 1.2), a děti bez amplifikace (hodnoty méně než 1.2). Skupina pacientů s amplifikací AML1 genu představuje 30 dětí, což je 39% všech vyšetřených pacientů, 13 z nich (43%) jsou pacienti s prokázanou hyperdiploidií a trisomií či tetrasomií chromosomu 21, ostatní představují pacienty buď s neprokázaným klonem +21 či pacienty se skutečnou amplifikací AML1 genu. Metodu ověříme prospektivním srovnáním s metodami FISH cílenými na chromosom 21 a komparativní genomové hybridizace (CGH). Pokud prokážeme její validitu, umožní nám rychle a jednoduše detekovat amplifikaci genu AML1 a zhodnotit její prognostický význam.

*Podporováno grantem IGA MZ 6509 a výzkumným záměrem MŠMT 111300003 a 111300005.*

# VLIV INHALACE AEROSOLU MINERÁLNÍ VODY NA ULTRASTRUKTURU EPITELU TERMINÁLNÍCH BRONCHIOLŮ

Jiří Uhlík

Ústav histologie a embryologie UK 2. LF v Praze  
školitel prof. MUDr. Václava Konrádová, DrSc.

Inhalace aerosolu minerální vody je běžnou součástí ambulantní i lázeňské léčby chronických respiračních onemocnění. Rozhodli jsme se proto v návaznosti na předchozí experimenty hodnotící vliv krátkodobé inhalace tohoto aerosolu na epitel trachey prostudovat také reakci epitelu distálních úseků dýchacích cest – terminálních bronchiolů. Laboratorní králíci inhalovali 10 min aerosol minerální vody používané v terapii respiračních chorob. Materiál pro elektronově mikroskopické vyšetření jsme odebírali ihned po inhalaci. Kvantitativně jsme hodnotili ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů, zvláště jsme se zaměřili na posouzení změn cytoplazmy sekrečních Clara buněk. Pro hodnocení nálezů jsme použili i počítačovou analýzu obrazu Lucia. Stejně jako u kontrolních králíků lemoval terminální bronchioly králíků po desetiminutové inhalaci aerosolu minerální vody jednovrstevný cylindrický epitel obsahující řasinkové a Clara buňky. Apikální spojovací komplexy byly intaktní, mezibuněčné prostory zůstaly úzké. Na apikálních površích řasinkových buněk jsme zaznamenali tvorbu cytoplazmatických protruzí, jež někdy vedla k zániku volných kinocilií. V hlubších oblastech jejich cytoplazmy jsme pozorovali mírné známky patologické alterace. Sekreční Clara buňky jeví tendenci k zvýšené proliferaci. Jejich relativní četnost v epitelu vzrostla statisticky významně ( $\alpha = 0,05$ ) oproti nálezům u kontrolních zvířat. Tato proliferace nebyla doprovázena zvýšeným vylučováním sekretu stádaného v sekrečních granulech. Počet Clara buněk obsahujících granula v cytoplasmě se nelišil od kontrolních hodnot. Jen velmi malá část Clara buněk jeví známky patologické alterace cytoplazmy, nepozorovali jsme však jejich degeneraci. Nálezy patologické alterace cytoplazmy epitelových buněk a jejich zvýšené proliferace vypovídají o nefyziologickém zásahu do homeostázy epitelu a nabádají k obezřetné indikaci i takto jednoduchých a zdánlivě neškodných terapeutických opatření.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. 111300003.

## ABNORMALITY IONTOVÉHO TRANSPORTU V ERYTROCYTECH DAHLOVÝCH POTKANŮ SE SOLNOU HYPERTENZÍ

M. Vokurková, Z. Dobešová, J. Kuneš, J. Zicha  
Fyziologický ústav AV ČR, Praha, Česká republika

Na erythrocytech Dahlových potkanů, kterým byla po odstavu podávána vysokosolná dieta, jsme studovali vztah mezi solnou hypertenzí a abnormalitami iontového transportu. Pozornost jsme věnovali hlavně Na,K-pumpě, Na,K-kotransportu a pasivní membránové permeabilitě (leak) pro  $\text{Na}^+$  resp.  $\text{Rb}^+$  ( $\text{K}^+$ ). Sůl-senzitivní (SS/Jr) kmen, v porovnání se sůl-rezistentním (SR/Jr) kmenem, vykazoval větší erythrocytární obsah  $\text{Na}^+$ , vyšší činnost Na,K-pumpy a Na,K-kotransportu a větší  $\text{Na}^+$  a  $\text{Rb}^+$  leak ( $p < 0.01$ ). Zvýšená aktivita Na,K-pumpy u SS/Jr potkanů byla provázána větším poměrem  $\text{Na}^+ : \text{Rb}^+$  ( $0.93 \pm 0.03$  vs  $0.82 \pm 0.03$ ,  $p < 0.025$ ).

U  $F_2$  hybridů ( $n=135$ ) krevní tlak kosegregoval s erythrocytárním obsahem  $\text{Na}^+$  ( $r=0.24$ ,  $p < 0.01$ ), s transportem  $\text{Na}^+$  zprostředkovaným Na,K-pumpou ( $r=0.25$ ,  $p < 0.01$ ) a s poměrem  $\text{Na}^+ : \text{Rb}^+$  ( $r=0.21$ ,  $p < 0.02$ ). V rozporu s naším očekáváním u  $F_2$  hybridů nebyla nalezena významná korelace mezi krevním tlakem a pasivní membránovou permeabilitou pro  $\text{Na}^+$  ani pro  $\text{Rb}^+$ .

Zvýšení poměru  $\text{Na}^+ : \text{Rb}^+$  Na,K-pumpy lze přičíst snížené výměně mezi  $\text{Rb}^+_o$  a  $\text{K}^+_i$  způsobené vyšším erythrocytárním obsahem  $\text{Na}^+$  resp. nižší plazmatickou hladinou  $\text{K}^+$ . Herrera a spol. uvádějí, že na zvýšeném poměru  $\text{Na}^+ : \text{Rb}^+$  se podílí mutace Q276L genu pro  $\alpha_1$  isoformu Na,K-ATPázy (1). Avšak naše studie ve spolupráci s Dominiczak a spol. (Western Infirmary, Glasgow) nepotvrdila hypotézu (2), že změněná  $\alpha_1$  isoforma Na,K-ATPázy u SS/Jr potkanů hraje důležitou úlohu v patogenezi solné hypertenze.

U  $F_2$  hybridů krevní tlak a transport  $\text{Na}^+$  z buňky zprostředkovaný činností Na,K-pumpy kosegregují s plazmatickými hladinami celkového cholesterolu ( $r=0.27$  a  $0.21$ ,  $p < 0.02$ ). Abnormální metabolismus lipidů lze tedy považovat za společnou příčinu vysokého krevního tlaku a změněné funkce Na,K-pumpy u sůl-hypertenzivních Dahlových potkanů.

1. Herrera V.L.M., Ruiz-Opazo N. *Science* 249: 1023-26, 1990.

2. Herrera V.L.M. et al. *J Clin Invest* 102: 1102-11, 1998.

Podporováno grantem A7011805 (Grantová agentura) a 305/00/1638 (GAČR)



