RANKMED – SYSTÉM PRO PODPORU EVALUACE WEBOVÝCH ZDROJŮ

Theodor ADLA, Aleš JANDA, Ústav lékařské informatiky, Pavel Kasal

Systém Rankmed je programový nástroj s webovým rozhraním sloužící k automatickému hodnocení kvality zdravotnických webových zdrojů. Systém bude zařazen jako specializovaný registr pod správu KSR-ZIS (Koordinační středisko pro resortní zdravotnické informační systémy). Systém by měl v budoucnu vést ke zkvalitnění webových zdravotnických zdrojů.

Východiskem byly naše předchozí práce z oblasti hodnocení informačních zdrojů na Internetu, ve kterých jsme se zabývali stanovením objektivních kvalitativních kritérií pro hodnocení webových stránek. Při volbě kritérií jsme vycházeli z mezinárodně uznávaných standardů pro publikování zdravotnických informací na Internetu jako jsou kupř. HONcode Principles, EC Quality Criteria for Health Related Websites či eHealth Code of Ethics. Vybrali jsme 20 kritérií popisující 4 hlavní oblasti webového zdroje - Prezentace, Navigace, Funkce a Věrohodnost.

Dále jsme stanovili relativní váhy pro jednotlivá kritéria. Stanovení důležitosti kritérií jsme provedli pomocí dotazníkové akce mezi studenty 2. lékařské fakulty a mezi uživateli zkušenými v hodnocení webových zdrojů.

Ve spolupráci s firmou ICZ a.s. byl vytvořen evaluační program, který automaticky vyhodnocuje vybrané parametry stránek. Bylo vytvořeno webové rozhraní pro komunikaci uživatelů s programem a s databází, kde jsou zdroje uloženy. Výsledky evaluace jsou prezentovány ve formě grafů.

Projekt je v současné době ve fázi testování. Webové rozhraní – tedy administrace uživatelů, práce se zdroji a grafické vyjádření výsledků je dokončeno a je vyhovující. Z prvních výsledků testování evaluačního programu vyplývá jeho prospěšnost při ověřování hodnot u většiny parametrů. Další výhodou systému je uchovávání minulých měření a tedy možnost srovnání z hlediska vývoje v čase.

Práce byla podporována výzkumným záměrem 2.LF J12/2000.

VYŠETŘENÍ CGH U NEUROBLASTOMU A ODVOZENÝCH REZISTENTNÍCH LINIÍ

Bedrníček J.*, Vícha A.*, Stejskalová E.*, Jarošová M.**, Eckschlager T.*
* Klinika dětské onkologie UK 2. LF a FNM ,** Hemato-onkologická klinika FN Olomouc
školitel: Doc. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Neuroblastom je druhým nejčastějším solidním nádorem dětského věku. Je to nádor biologicky velmi variabilní, s průběhem onemocnění od spontánní regrese až po progresi nejmalignějších forem. Již dlouhou dobu jsou známy vazby mezi jednotlivými formami průběhu a chromozomálními změnami. Mezi změny nejčastěji popisované jako markery pojící se s vysokým rizikem patří amplifikace NMYC (2p24.1), delece 1p36 a zmnožení genetického materiálu 17q. Na výběru terapie se spolu s genetickými markery (NMYC a DNA ploidie) podílejí další prognostické znaky (věk, klinické stádium a grade).

K průkazu cytogenetické heterogenity nádoru jsme použili metodu komparativní genomické hybridizace (CGH). Vyšetřili jsme celkem 5 neuroblastomů a 3 neuroblastomové buněčné linie. Tři z nádorů byly vysokého rizika a dva rizika nízkého.

Nejčastěji jsme chromozomální změny detekovali na chromozómech 1, 2, 17, 11 a 13.

U nádorů nízkého rizika se jednalo o zmnožení či deleci celého chromozómu zatímco pro nádory vysokého rizika jsou častěji typické zmnožení či delece genetického materiálu jen části chromozómu. U skupiny nádorů vysokého rizika jsme prokázali amplifikaci v oblasti 2p24.1 odpovídající onkogenu NMYC, který je jednoznačně nejsilnějším z prognostických znaků určujících biologickou povahu nádoru. Tuto amplifikaci jsme prokázali i metodou FISH.

U nádorových buněčných linií jsme kromě klasické CGH (porovnání s nenádorovou DNA) provedli též komparaci DNA mateřské linie a od ní odvozené linie resistentní k cytostatikům. Prokázali jsme významné změny na chromozomech 1, 4, 7, 16, 17, 19, 20 a 22 u rezistence na doxorubicin, změny na chromozomech 5, 7, 8, 16, 17, 18 a 19 u rezistence na vincristin a mnohotné chromozomální změny u rezistence na cisplatinu. Klonalita nádoru a vznik rezistence k cytostatikům významně ovlivňuje terapeutické možnosti a tím úspěšnost léčby. Vyšetření CGH tak ukazuje, že na vzniku chemorezistence se podílí kromě změn exprese také chromozomální aberace.

IMUNOTERAPIE DENDRITICKÝMI BUŇKAMI U OVARIÁLNÍHO KARCINOMU

BENEŠOVÁ, K., CZETőOVÁ, Z., ŠPÍŠEK, R., POSPÍŠILOVÁ, D., BARTŮŇKOVÁ, J.
Ústav imunologie UK 2.LF, Praha
Školitel: doc. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSC.

Úvod: Dendritické buňky (DC) jsou antigen-prezentující buňky schopné zahájit primární imunitní odpověď. Tato vlastnost je činní vhodné k užití v konsolidační terapii u malignit, zvláště ve fázi minimální reziduální nemoci. Účinnost tohoto předpokladu byla ověřena u některých hematologických malignit a melanomu. Nyní se zkouší další malignity u nichž by bylo možno užít tento způsob léčby (karcinom prostaty, prsu, ovarii…)**Cíl:** Naším cílem bylo vypracování protokolů na získání čistých nádorových antigenů z ascitu a nádorové hmoty u pacientek s ovariálním karcinomem. Získání nezralých DC z periferních monocytů. Pulzace DC nádorovými antigeny.**Metodika:** Nádorové buňky (antigeny) byly izolovány z ascitu pomocí ficoll- gradientu, z nádorové masy enzymatickou digescí a následně fikol. gradientem. Monocyty byly izolovány a kultivovány z periferní krve pacientek s ovariálními karcinomy (odebrané před začátkem chemoterapie) a následně přeměné na nezralé DC za přítomnosti GM-CSF a IL 4 . Morfologické i fenotypické znaky DC byly ověřeny FACS analysou. Nádorové antigeny ve formě lyzátu z 3-5x 10^6 nádorových buněk/ml byly použity k pulzaci dendritických buněk v poměru 1:1 a 3:1 sedmý den jejich kultivace. Po dvou hodinách byly nádorové antigeny odstraněné centrifugací. Lymfocyty a dendritické buňky (pulzované i nepulzované) byly kokultivovány sedm dní za současné stimulace IL 2. Proliferace lymfocytů byla měřena pomocí na H_3 Thimidinu beta counteru. **Výsledky:** Podařilo se nám izolovat nádorové buňky v čistotě 90% a více. Úspěšně byly kultivovány nezralé DC z periferních monocytů a pulzovány nádorovymi antigeny. T lymfocyty vykazovaly proliferační aktivitu po kokultivaci s pulzovanými DC, avšak ne tak vysokou jak presentují práce využívající zralé DC. Proto jsme se v dalších pokusech rozhodli zařadit maturační faktor.
Závěr: Doufáme, že v budoucnosti se tímto směrem bude ubírat konsolidační terapie u nádorových onemocnění ovarií.

VLIV KLINICKY UŽÍVANÝCH IMUNOMODULANCIÍ NA MATURACI DENDRITICKÝCH BUNĚK

Brázová, J., Špíšek, R.
Ústav imunologie UK, 2. LF a FN Motol
Školitelka: Doc. Šedivá, A.
E-mail: jitka.brazova@centrum.cz

Úvod: Dendritické buňky (DC) jsou jediné antigen prezentující buňky (APC) schopné vyvolat primární imunitní odpověď. Tuto schopnost získávají až po procesu zvaném maturace. V tomto pokusu jsme zkoumali zda imunostimulační účinek klinicky široce užívaných léků (Biostim^R, Bronchovaxom^R, Luivac^R, Immodin^R, Imudon^R, Imunor^R, Ribomunyl^R) je způsoben jejich přímým působením na maturaci a aktivaci dendritických buněk.
Materiál a metody: DC byly získány z monocytů (moDC) periferní krve kultivovaných v přítomnosti GM-CSF a IL-4 v médiu X-VIVO 15. Pátý den byly k nezralým DC přidány různé koncentrace výše zmíněných imunomodulancií. Takto zahájený proces maturace byl následně hodnocen fenotypicky (cytometrická FACS analýza) a funkčně (sekrece IL-12 a IL-10, schopnost fagocytózy, stimulace T-buněčné proliferace.
Výsledky: Luivac^R, Ribomunyl^R a v menší míře Imunor^R a Biostim^R jsou mocnými aktivátory DC. Míra aktivace DC byla ve všech vyšetřovaných případech srovnatelná nebo dokonce vyšší než u známých maturačních stimulancií jako je Poly (I:C) nebo
LPS. Ve shodě s fenotypem zralých DC u nich byla výrazně redukována schopnost fagocytózy a zároveň významně vyjádřena schopnost stimulace allogenních T lymfocytů.
Závěr: Zkoumali jsme důsledek interakce mezi maturovanými moDC a některými léky, běžně klinicky užívanými, k ovlivnění imunitního systému. Prezentované výsledky jsou důležité pro pochopení mechanizmu účinku těchto léků na lidský organismus. Předepisování imunomodulancií by mělo být velice uvážlivé, aby nedocházelo ke zvýšení rizika vyvolání autoimunitních onemocnění. Imunomodulancia by mohla být používána jako maturační činidla v protokolech ex vivo produkce moDC pro klinické imunoterapeutické pokusy.

PLAZMATICKÉ HLADINY OREXINU A U OBÉZNÍCH DĚTÍ.

Bronský, J. [1], , Nedvídková, J. [2], Pechová, M. [1], Šrámková, D. [2], Průša, R. [1]
[1] Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol, Praha
[2] Endokrinologický ústav, Praha
školitel: Doc. MUDr. Richard Průša, CSc.

Orexin A je hypothalamický neuropeptid zvyšující příjem a trávení potravy. Buňky produkující Orexin A jsou glukosenzitivní a mají na svém povrchu receptory pro leptin. Intracerebroventrikulární aplikace Orexinu A působí na zvířecím modelu zvýšení příjmu potravy, motility a sekrece trávicího traktu. Krátkodobá restrikce příjmu potravy zvyšuje koncentraci preproorexinové mRNA v laterální hypothalamické oblasti. U obézních dospělých jedinců byly naměřeny snížené plazmatické hladiny Orexinu A.

Zjišťovali jsme plazmatické hladiny Orexinu A u 24 obézních pacientů (18 dívek a 6 chlapců; průměrný věk 13,8 a 15,9 roků) na začátku a po ukončení 5 týdenní lázeňské redukční léčby obezity. Hladiny Orexinu A byly stanoveny RIA metodou s extrakcí. Dále jsme u pacientů stanovovali sérové hladiny leptinu, IGF1, IGFBP-3, celkového cholesterolu a množství tělesného tuku.

Průměrné plazmatické hladiny Orexinu A u obézních dívek před redukční terapií byly v rozmezí 15,31 ± 1,62 ng/l (mean ± SEM) a po ukončení terapie 21,44 ± 2,747 ng/l a u chlapců 8,01 ± 1,62 ng/l a 14,48 ± 2,335 ng/l. Plazmatické hladiny Orexinu A byly signifikantně vyšší jak u dívek ($p = 0,0349$) tak u chlapců ($p = 0,0419$) po redukci tělesné hmotnosti. V obou skupinách jsme zjistili negativní korelaci mezi hladinami Orexinu A a množstvím tělesného tuku.

Během snížení množství tělesného tuku u dětí se zvyšují plazmatické hladiny Orexinu A a snižují hladiny leptinu. Hypothalamická produkce Orexinu A může být ovlivněna negativní zpětnou vazbou z tukové tkáně prostřednictvím leptinových receptorů.

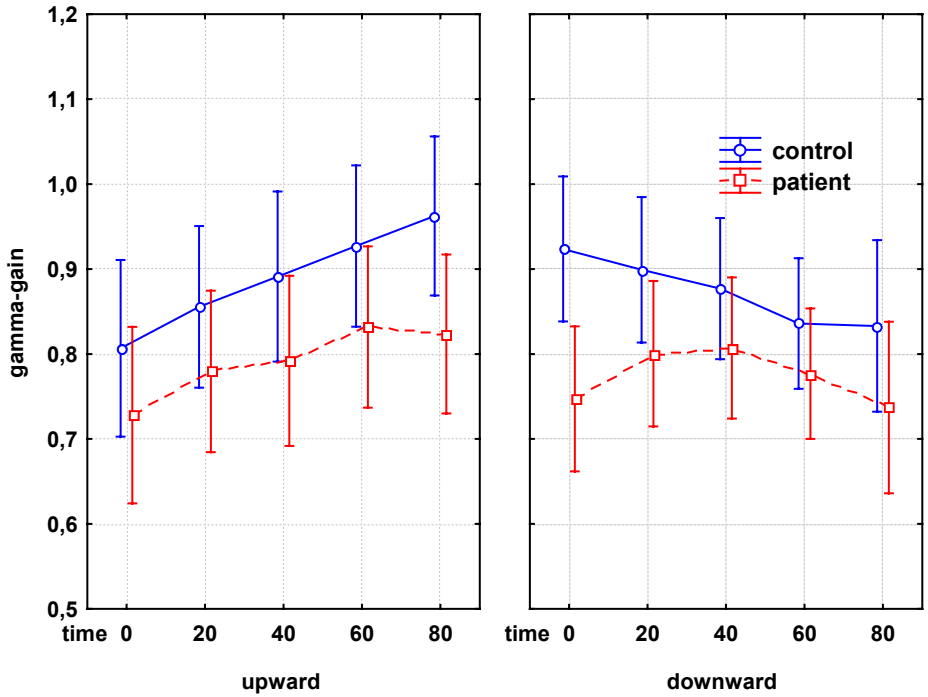
Projekt byl podpořen grantem IGA MZ NB 6597-3 a Institutem DANONE.

TESTOVÁNÍ VESTIBULÁRNÍ HYPOTÉZY PATOMECHANISMU DOWNBEAT NYSTAGMU VERTIKÁLNÍMI HEAD IMPULSY

R. Brzezny, S. Glasauer, H. von Lindeiner, Ch. Siebold, J.Jeřábek, U. Büttner
Neurologická klinika dosp., Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta
Jméno školitele:*doc.MUDr.Jaroslav Jeřábek,CSc.*

Abstrakt:

Úvod: Downbeat nystagmus (DB) je fixační nystagmus s rychlou fází směrovanou dolů při pohledu před sebe. Patomechanismus DB není doposud znám. Je předpokládaná porucha centrálních drah v rámci centrálního vestibulárního syndromu nebo selhání neuronálního integrátoru. Cílem výzkumu bylo testování obou hypotéz vyšetřením semicirkulárních kanálků a vestibulárních drah u pacientů s DB. **Metodika:** Bylo vyšetřeno 10 pacientů s DB a 10 zdravých věkově shodných jedinců. Využitím metodiky magnetického search-coilu byla zkoumána reakce vestibulo-okulárního reflexu (VOR) na pasivní manuálně provedné rotační stimulace hlavy s vysokou akcelerací – head impulsy, ve vertikální rovině. Odpověď systému v prostoru byla kvantitativně vyjádřená poměrem amplitud vstupu a výstupu v trojrozměrném koordinátovém systému - *γ-gainem.* **Výsledky:** Pacienti vykazovali pomalý drift vzhůru odpovídající základní diagnóze od 0,6 deg/s do 4,9 deg/s (průměr±SD, 2,4±0,5 deg/s). Po odečtu driftu byly srovnány odpovědi obou skupin. Byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi skupinami v amplitudě odpovědí na rotační stimulaci (γ-gain 0.88±0.02 pro zdravé, 0.78±0.02 pro pacienty). Nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v gainu mezi vzhůru a dolů směřujícími head impulsy u DB pacientů. **Diskuze:** Zjištěná fakta nepodporují hypotézu centrálního vestibulárního syndromu jako příčiny DB nystagmu. Rozdíly v γ-gainu mezi skupinami jsou patrně z důvodu poškozeného neuronálního integrátoru, kterého správná funkce je kruciální pro pozdní odpověď ve VOR.



graf : γ-gain pro vertikální head impulsy u pacientů a kontrol pro vzhůru a dolů směřující head impulsy (sloupce vyjadřují 95% interval spolehlivosti).

MEZINÁRODNÍ DATABÁZE TOURETTEOVA SYNDROMU: PILOTNÍ PROJEKT V ČESKÉ REPUBLICE.

FIALA O., **RŮŽIČKA E.**, Neurologická klinika UK 1. LF a VFN, Praha
Školitel: Prof. MUDr. Evžen Růžička, DrSc.

Touretteův syndrom (TS) je neuropsychiatrické onemocnění charakterizované mnohočetnými motorickými a zvukovými tiky a často doprovázené poruchami chování. V roce 1992 byla založena mezinárodní databáze TS, za účelem lepšího porozumnění klinickému obrazu této nemoci. Na přehledu, který zahrnul 3500 pacientů, se podílela odborná pracoviště z 22 států (Freeman et al. 2000). Od roku 2001 se projektu účastní Centrum extrapyramidových onemocnění Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Naši pacienti byli zařazeni podle diagnostických kritérií Tourette Syndrome Study Group. Krom začlenění našich dat do mezinárodní databáze jsme provedli kritické srovnání našich výsledků s údaji z celé databáze. Do konce dubna 2002 bylo do souboru zahrnuto celkem 50 osob, z toho 36 mužů a 14 žen. Průměrný věk pacientů byl 21,9 let (od 9 do 76). Průměrný věk objevení prvních příznaků byl 7,6 let (2–19). Věk při určení diagnózy činil 16,2 roku (5-50), což je o tři roky více, než je celosvětový průměr (13,2 roku). Pozitivní rodinnou anamnézu mělo 21 (42%) pacientů. Vznik či prudké zhoršení tiků po prodělané infekci udávalo 6 (12%) nemocných. Prenatální nebo perinatální problémy mělo 15 (30%) pacientů. Medikaci pro léčbu tiků užívalo 41 (82%) pacientů, což je o 22% více něž výsledek mezinárodní databáze (60%). 8 (16%) pacientů nemělo kromě tiků žádné jiné potíže (čistý TS). Porucha pozornosti byla zjištěna u 17 (34%) nemocných, obsedantně-kompulzivní porucha u 11 (22%) a sebepoškozování u 8 (16%). Naše výsledky poskytují cenné informace o klinickém obrazu TS v České republice a díky detailní dokumentaci našich pacientů se tato data stávají důležitým východiskem pro další genetické, klinické či farmakologické studie.

Ref.: *Freeman et al. An international perspective on Tourette syndrome: selected findings from 3500 individuals in 22 countries. Dev Med Child Neurol 2000;42:436-47*

HYPEROXIE BRÁNÍ ZVÝŠENÍ FRC ZPŮSOBENÉ APLIKACÍ KARAGININU U POTKANŮ

Fišárková, B.,Vízek, M.
Ústav patofyziologie, 2.LF UK a Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév, Praha, Česká republika
školitel: prof.MUDr M.Vízek

Pneumonie způsobená aplikací karagininu nebo paraquatu zvyšuje funkční reziduální kapacitu plic (FRC) u potkanů. Mechanizmus tohoto zvýšení není jasný, ale za jednu z možných příčin je považováno snížení pO_2. Pro ověření této hypotézy jsme se pokusili eliminovat snížení pO_2 tím, že jsme potkany, kterým byl aplikován karaginin, umístili do hyperoxické komory.

29 potkanů bylo rozděleno do 4 skupin. Potkanům z 1. skupiny byl aplikován intratracheálně karaginin (0,5ml 0,7% ve fyziol. roztoku) a byly umístěni na 7 dní do hyperoxie (FiO_2 0,78-0,84, skupina Karag+hyperoxie), potkanům z 2. skupiny byl aplikován stejným způsobem karaginin, ale byly ponecháni na vzduchu (Karaginin), 3. skupina potkanů byla umístěna na 7 dní do hyperoxie (Hyperoxie) a 4. skupina byla kontrolní (Kontroly). Po týdnu jsme zvířata v anestezii intubovaly a změřili jsme jejich ventilační parametry a FRC během dýchání vzduchu.

Aplikace karagininu měla za následek zvýšení FRC (Karaginin 2,0±0,2ml, Kontroly 1,6±0,1ml, průměr±SEM). U potkanů umístěných po aplikaci karagininu do hyperoxie k tomuto zvýšení nedošlo (Karag+hyperoxie 1,6±0,1ml). Hyperoxie samotná hodnoty FRC neovlivnila (Hyperoxie 1,5±0,1ml). Tyto výsledky podporují hypotézu, že snížení pO_2 hraje významnou úlohu při zvýšení FRC indukované aplikací karagininu u potkanů.

Tato práce byla podporována grantem GAČR 305/97/S070 a Výzkumným záměrem MŠM č.11300002.

DEVELOPMENT OF A RAT MODEL OF CHRONIC INTESTINAL OBSTRUCTION. Gálvez Y, Škába J. Pracoviště: Klinika dětské chirurgie LF Motol Praha. Školitel: Doc. MUDr. Richard Škába CSc

Background: Clinical observations support the notion of a relationship between intestinal obstruction and enteric dysplasia. Only few studies, however, have investigated the response of the enteric nervous system (ENS) to chronic intestinal obstruction (CIO). Studies on animals have showed that, (1) The intestine of the rat is in general terms similar in structure to the human bowel; (2) Marked developmental changes, however, can be observed during the early postnatal life in the rat;(3) Surgical techniques for CIO are critical in securing appropriate survival; and, (4) Immunostaining techniques used in the study of the structure of human ENS or CNS may not work properly in rats. On this basis, the aim of our study was to develop a rat model of CIO suitable for the study of ENS anomalies. **Methodology:** A cut-off time point of 6 weeks was set for CIO. Three different surgical techniques intended to cause CIO (at distal colon level) in Winstar rats were tested, as follows: Procedure A, serosal partial external suture; Procedure B, external partially-strangulating Goretex ring; Procedure C, external partially-strangulating encircling ligature fixed to the mesenterium. Constant monitoring on the development of symptomatology of acute obstruction, enterocolitis and perforation/sepsis was secured. A panel of histochemical staining techniques was additionally tested for use in the study of the ENS in rats. **Results**: Procedure A caused compensatory bowel dilation that lowered the degree of effective intestinal obstruction to about 10% of the bowel lumen (as assessed by contrast study). Fourteen of 20 rats survived longer than 6 weeks (survival time range: 2 weeks to 6 months). Procedure B produced enterocolitis and perforation/sepsis in all animals (n=7). The cut-off CIO time point was not reached in this group (range: 1 to 4 weeks). Procedure C was better tolerated, 4 out of 7 subjects survived to the cut-off point (range: 3 to 8 weeks). Staining techniques that allowed appropriate identification of ENS structures included AChE, NADH, hematoxylin-eosine and anti S-100 protein. **Conclusions:** Procedures A and C might be used for the development of different degrees of surgical CIO in rats. Procedure C does not cause compensatory bowel dilation. The degree of obstruction can be controlled by tightening the ligature. AChE, NADH, hematoxylin-eosine and anti S-100 protein stainings allow appropriate differentiation of ENS structures.

FERTILITA NBS HETEROZYGOTEK

Gebertová, K.
Pracoviště: Ústav biologie a lékařské genetiky 2.LFUK, Klinika dětské neurologie 2.LFUK
Školitel: prof. MUDr. Seemanová E., DrSc.
E-mail autora: katerina.gebertova@tiscali.cz

Nijmegen breakage syndrom (NBS) je jedním z autozomálně recesivně dědičných syndromů chromozomální instability. NBS je podmíněn dědičnou poruchou reparace DNA. Odpovědný gen, *NBS1*, je lokalizován na 8q21 a je tumor supresorovým genem.
NBS se vyskytuje s vysokou frekvencí ve slovanské populaci a je důsledkem homozygotní delece 5bp (657del5) . Vysoká frekvence této mutace již nemůže být vysvětlena genetickým driftem v izolovaných subpopulacích a vede nás k hypotéze, že NBS heterozygoti mohou mít selekční výhodu oproti normálním homozygotům představovanou vyšší reprodukční zdatností.
Studie v 18 rodinách s výskytem NBS sledovala reprodukci 94 žen, jejichž genotyp byl zjištěn DNA analýzou (Seemanová et al., 2002). Reprodukce žen heterozygotních pro NBS mutaci byla charakterizována vyšším počtem porodů a nižším počtem spontánních potratů ve srovnání s jejich ženskými příbuznými bez NBS mutace, což podporovalo hypotézu vyšší genetické zdatnosti heterozygotek.
Studii jsme rozšířili na sledování reprodukce 162 žen z 22 NBS rodin a 4 rodin onkologických pacientů heterozygotních pro germinální mutaci v *NBS1* genu.
Průměrný počet porodů nebyl v obou skupinách signifikantně odlišný (2,7 resp. 3,0) a počet porodů dvojčat odpovídal v obou skupinách výskytu v populaci. Procento spontánních potratů bylo nižší ve skupině žen NBS heterozygotních. Chromozomální aberace představují až 80% etiologie spontánních potratů, nižší frekvence spontánních potratů u NBS heterozygotek může být důsledkem jejich lepší ochrany před nondisjunkcí.

HYPOXIA A REOXYGENÁCIA ZVYŠUJÚ PRODUKCIU H_2O_2 U POTKANOV.

Hitka, P., Wilhelm, J.[1] a Vízek, M.
Ústav patologické fyziologie a [1]Ústav lékařské chemie a patobiochemie, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Praha

Pre sledovanie zmien produkcie reaktívnych kyslíkových zlúčenín (ROS) v pľúcach v priebehu prechodu z hypoxie do normoxie sme merali produkciu peroxidu vodíka v expirovanom vzduchu potkanov dýchajúcich hypoxickú zmes, vzduch, alebo 100 % kyslík na konci 72 hodinovej expozícii hypoxii. 21 samcov potkanov Wistar (200 - 280 g) bolo rozdelených do jednej z troch skupín. Dve experimentálne skupiny boli 72 hodín v normobarickej hypoxickej komore (F_IO_2 0,1), kontrolné skupiny boli len na vzduchu. Na konci expozície potkany boli anestetizované, intubované, vložené do telového pletyzmografu a bola meraná ich ventilácia a produkcia H_2O_2. Produkcia H_2O_2 bola meraná ako množstvo H_2O_2 v kondenzáte expirovaného vzduchu zberaného 1 hodinu podľa navrhnutého systému: v kontrolnej skupine dvakrát v priebehu dýchania vzduchu, v prvej experimentálnej skupine v hypoxii (F_IO_2 0,1) a potom v priebehu dýchania vzduchu (H-H-V skupina), v druhej experimentálnej skupine najprv v priebehu dýchania vzduchu a následne v hyperoxii (F_IO_2 1,0, *H*-V-O_2). Koncentrácia H_2O_2 v kondenzáte bola stanovená chemiluminiscenčne.

Produkcia H_2O_2 kontrolných skupín bola nízka a podobná v oboch po sebe idúcich meraniach (20±10 a 13±5 pmol/h, priemer±SEM). Expozícia 72-hodinovej hypoxie zvýšila produkciu H_2O_2 na 105±18 pmol/h pri meraní v hypoxii. Následné zvýšenie bolo vidieť pri prechode do normoxie (366±19 pmol/h v priebehu merania na vzduchu v *H*-H-V a 421±24 pmol/h pri meraní na vzduchu v *H*-V-O_2). Prechod z dýchania vzduchu k hyperoxii nemení produkciu H_2O_2 (373±25 pmol/h, *H*-V-O_2).

Táto práca bola podporená grantmi GAČR 305/01/0794 a IGA MZČR NE/6450-3

HEREDITÁRNÍ TROMBOFILIE U RIZIKOVÝCH SKUPIN PACIENTŮ - VÝSLEDKY GRANTOVÉHO PROJEKTU

Hladíková, E.[1], Hadačová, I.[2], Vavřincová, I.[3], Petrák, B.[4], Dvořáková, H.[6], Vilímová, Š.[1], Brandejská, M.[5], Špálová, I.[5], Macek, M., Jr.[1]
[1]ÚBLG – Molekulárně genetická laboratoř CF Centrum a Laboratoř reprodukční biologie a medicíny , [2]Odd.klinické hematologie, [3]II.DK, [4]Dětská neurologická klinika, [5]Gynekologicko-porodnická klinika, [6]Neurologická klinika ; všichni FN Motol a 2.LF UK Praha;
Školitel: MUDr. Milan Macek Jr. DrSc. Eva.Hladikova@lfmotol.cuni.cz

Trombofilie je nerovnovážný stav prokoagulačních, antikoagulačních a fibrinolytických mechanismů pacienta, který vede ke zvýšenému riziku trombózy jak v žilním, tak i arteriálním řečišti. Na jejím vzniku se vhledem k její multifaktoriální patogeneze podílí velké množství získaných i hereditárních rizikových faktorů. Na našem pracovišti byly od roku 1999 molekulárně geneticky vyšetřeny markery hereditární trombofilie: Leidenská mutace-FV-L 1691G->A v genu pro faktor V, FII 20210G-> A v genu pro protrombin (FII) a polymorfismus 677C->T v genu pro metylentetrahydrofolátreduktázu (MTHFR) u celkem 34 dětí/193 dospělých pacientů s hlubokou žilní trombózou, 25 dětí/76 dospělých s ischemickými cévními mozkovými příhodami, 157 žen s komplikacemi v těhotenství (opakovanými spontánními potraty v I. a II. trim, preeklampsií, intrauterinní růstovou retardací plodu a porody mrtvého plodu). V rámci ověřování selekční výhody mutace FV-Leiden pro časnou embryonickou implantaci jsme vyšetřili také 79 pacientek s opak. neúsp. IVF technik do 35 let věku. Nejprve jsme stanovili populačně specifické frekvence trombofilních mutací u 218 náhodně vybraných zdravých jedinců v reprodukčním věku: FV-L 25/436-5,7%, FII 20210G->A 3/130-2,3%, MTHFR 677C->T 74/198-37,4%. Dále jsme provedli case control studie s celkem 596 pacienty s trombofilní anamnézou, kteří byli rozčleněni podle klinických a laboratorních kritérií do jednotlivých, výše uvedených souborů. Statisticky signifikantní asociace s trombofilií na podkladě mutace FV-Leiden (chi square-χ^2) byla nalezena u dětského a dospělého souboru s hlubokou žilní trombózou a plicní embolií (12/68-17.6% resp. 57/386-14.7% $p<0.001$), u dospělých pacientů s ischemickými cévními mozkovými příhodami ve věku > 45 let (10/84-11.9% $p<0.05$). V reprodukčních patologiích byla nalezena asociace FV-L v souboru pacientek s anamnézou porodu mrtvého plodu (11/80-13.8% $p<0.01$). U souboru pacientek s opak. neúspěchy IVF technik vyšetřovaného v rámci našeho studia selekční výhody mutace FV-Leiden byla nalezena hraničně signifikantně snížená frekvence mutace FV-L oproti kontrolám (3/158-1.9% p=0.034, 1-sided Fisher exact test). Vzhledem k souhrnné povaze tohoto abstraktu neuvádíme data, které nedosáhly statistické významnosti (frekvence FII 20210G->A vs kontroly a MTHFR 677C->T vs kontroly). Naše výsledky potrvrzují u uvedených skupin patologií účelnost vyšetření alespoň Leidenské mutace.

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

EXPOZICE CHRONICKÉ HYPOXII NEBRÁNÍ VZNIKU ARTERIÁLNÍ HYPOXÉMIE

Hodyc D, Herget J. Ústav fyziologie Univerzity Karlovy 2. Lékařské fakulty a Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév.

Hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV) je fyziologickým regulačním mechanismem, který snižuje perfuzi špatně ventilovanými oblastmi v plicích. Tím omezuje podíl venózní příměsi a brání vzniku arteriální hypoxémie. V minulé sérii pokusů, jejichž výsledky byly prezentovány na loňské SVK, jsme zjišťovali význam tohoto regulačního mechanismu při celkové ventilační hypoxii plic (ventilace plic směsí plynů s 10, 3 a 0 % kyslíku). Prokázali jsme nepřímo úměrnou závislost mezi velikostí HPV a poklesem parciálního tlaku kyslíku měřeného ve výtokové plicní kanyle. Dospěli jsme k závěru, že i v podmínkách celkové ventilační hypoxie plic brání HPV vzniku arteriální hypoxémie. Pravděpodobnou příčinou je nerovnoměrná distribuce kritických uzavíracích tlaků v plicních cévách. V prezentované studii jsme se zabývali otázkou, zda je tento regulační mechanismus ovlivněn dlouhodobým pobytem v hypoxickém prostředí.

Pokusy byly prováděny na samcích laboratorního potkana, přičemž jednu skupinu zvířat jsme na 12 – 16 dní umístili do hypoxické normobarické komory (koncentrace kyslíku ve vdechovaném vzduchu byla 10%), druhá, kontrolní skupina, byla ponechána na vzduchu. Použili jsme preparát izolovaných plic perfundovaných konstantním průtokem (4 ml/min/100 g t. hm.) solným roztokem s 4% albuminem, L-NAME ($5x10^{-5}$M) a meklofenamátem ($17x10^{-6}$M) a ventilovaných 21% O_2 + 5% CO_2 a nebo 10, 3 a 0% O_2 + 5%CO_2. V průběhu pokusu byl kontinuálně registrován arteriální perfúzní tlak a parciální tlak O_2 ve výtokové plicní kanyle.

Zjistili jsme, že pokles parciálního tlaku O_2 při ventilaci hypoxickou směsí plynů (3% a 0% O_2) je výrazně vyšší u zvířat vystavených chronické hypoxii než u zvířat normoxických ($p<0,001$) a že vystavení chronické hypoxii zvyšuje práh pro akutní hypoxickou vazokonstrikci. Při porovnávání změn perfuzního tlaku a parciálního tlaku kyslíku jsme neprokázali žádnou závislost mezi velikostí vazokonstrikční odpovědi a poklesem pO_2 ve výtokové plicní kanyle (R=0,021). Při chronické hypoxii dochází ke zmnožení pojiva a hladkého svalu v plicních cévách, což vede ke snížení jejich poddajnosti a zároveň chronická hypoxie inhibuje hypoxickou vazokonstrikční odpověď.

Závěr: Chronická expozice ventilační hypoxii snižuje účinnost mechanismu hypoxické plicní vazokonstrikce a tedy nebrání vzniku arteriální hypoxémie při akutní hypoxii.

MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA MARKER CHROMOZOMŮ A JEJÍ VÝZNAM PŘI PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE

Hrabáková, J., Strnad, M., Pánek, M., Kočárek, E.
Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF
Školitel: RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.

Moderní vyšetřovací metody umožňují vysvětlit a odhalit množství geneticky podmíněných onemocnění již před narozením jedince. Významnou roli v prenatální diagnostice hraje vyšetření chromozomálních aberací. V současné době jsme schopni stanovit nejen karyotyp plodu, ale moderními molekulárně cytogenetickými metodami vyšetřit mikrodeleční syndromy a submikroskopické chromozomální přestavby. Ukazuje se, že i malá změna může být klinicky velmi významná. V naší prezentaci dokumentujeme a diskutujeme možnosti prenatální a postnatální diagnostiky marker chromozomů s určením možné klinické závažnosti a míry postižení. Pro určení původu těchto dysmorfických, zpravidla nadpočetných chromozomů používáme metodu fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s alfa centromerickými a lokus specifickými sondami, které umožňují nejen objasnit původ marker chromozomu ale zčásti také mapovat jeho rozsah. V práci je kladen důraz na markery vzniklé jako pseudoizodicentrické chromozomy z akrocentrického chomozomu 15. Na základě publikovaných výsledků a vlastních pozorování prezentujeme návrh algoritmu, jenž by mohl vést k přesnějšímu stanovení míry postižení plodu a bližšímu odhadu jeho další prognózy. To je důležité zejména u těhotenství, kde byl u plodu prokázán izodicentrický chromozom 15. Náš soubor obsahuje 21 pacientů, u kterých byl cytogeneticky prokázán marker chromozom, z čehož u 4 pacientů der(15). Funkčnost prezentovaného postupu dokumentujeme několika kazuistikami a srovnáváme s publikovanými nálezy. Práce byly finančně podpořeny granty FRVŠ 2482/2002 a IGA6912-4 a výzkumným záměrem UK 2.LF č.111300003.

KVANTITATIVNÍ SLEDOVÁNÍ DNA HERPETICKÝCH VIRŮ POMOCÍ REAL-TIME PCR U PACIENTŮ PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK.

Hubáček, P. [1], Cinek, O. [1], Sedláková, P. [1], Voslářová, S. [1], Zajac, M.[2], Starý, J. [1], Sedláček, P. [1]
[1]Laboratoř mol. genetiky II. dětské kliniky 2. LFUK, [2]Ústav lék. mikrobiologie 2. LFUK
Školitel: Prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.
Email: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

Virové infekce bývají vážnou komplikací u pacientů po alogení transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT). U skupiny herpesvirů je možná díky těžké imunosupresi reaktivace latentních stadií infekce. V letech 2001 a 2002 jsme prospektivně vyšetřili celkem 1104 vzorků od 48 pacientů po HSCT. Virová nálož byla retrospektivně vyšetřena také u vzorků dalších čtyř pacientů s EBV lymfoproliferativním onemocněním (EBV-LPD). Při prospektivním sledování byl průměrný věk 9,7 let ± 5,8 roku a průměrný počet vzorků 24 na jednoho. Zastoupení diagnos pro které byli pacienti transplantováni : ALL (25%), CML (13,6%), SAA (13,6%), AML (9%), MDS (9%), SCID (4,5%), MPS (4,5%), WAS (2,3%), NHL (2,3%), HLH (2,3%) a další . DNA byla izolována z buněk separovaných z periferní krve. V těchto vzorcích byla kvantifikována virová nálož EBV, CMV, HHV_6 a počet kopií genu pro albumin pomocí real-time PCR. Výsledky byly normalizovány na počet genomických ekvivalentů (GE). Pro jasně pozitivní nález jsme si stanovili hranici 50 kopií na 10^4 GE. Nad tuto hranici se dostalo 11 pacientů u EBV (u 24 byla pozitivita nižší), 8 pacientů u CMV a 9 u HHV_6 (dalších 22 mělo nižší virovou nálož). Všichni retrospektivně vyšetřovaní pacienti zemřelí na EBV-LPD překročili hranici 10^4 kopií / 10^4 GE. U dvou pacientů byl detekován prudký nárůst EBV virové nálože. Díky včasnému záchytu jim byl podán Rituximab/Mabthera (anti CD 20) a u obou virová nálož klesla. U 4 pacientů jsme detekovali před podáním virostatik až 10^3 kopií CMV / 10^4 GE. Zatím jsme nenalezli žádný klinický korelát HHV_6 infekce u dětí po HSCT. V uvedeném období i díky preemptivní terapii žádný pacient na infekci těmito herpetickými viry nezemřel.

KLINICKÉ STUDIE V ČESKÉ REPUBLICE

Aleš JANDA., Theodor ADLA, Ústav lékařské informatiky UK 2. UK,
školitel: Pavel Kasal

Cíl práce: Vyhodnocení randomizovaných kontrolovaných studií (RCT) uveřejněných v časopisech ČLS JEP a zpětné posouzení těchto studií v rámci renomovaných bibliogr. databází. *Metodika:* Byly prohledány online dostupné obsahy časopisů vydané v r. 1999-2002 Nakladatelským a tiskovým střediskem ČLS JEP (NTS ČLS JEP). Zaznamenány byly práce, které v názvu nebo v abstraktu uvádějí, že se jedná o RCT; sledována byla také přítomnost RCT mezi klíčovými slovy; zaslepení, ev. kvalita studií nebyly zohledňovány. Následně byly zadány dotazy na vyhledání RCT do bibliografických databází Bibliographia Medica Čechoslovaka (BMČ), Medline, Embase a bylo sledováno, zda byly nalezeny i studie získané manuelně. *Výsledky:* Celkem bylo nalezeno 46 studii, u žádné z nich nebylo RCT mezi klíčovými slovy. V roce 1999 bylo publikováno 7 studií, v následujících letech pak 11, 19, 11, a to v těchto časopisech (v závorce počet studií, M – časopis indexován v Medline, E – časopis indexován v Embase): Acta Chirurgiae Plasticae (2, M, E), Anesteziologie a neodkladná péče (7), Central European Journal of Public Health (4, M, E), Časopis lékařů českých (2, M, E), Česko-slovenská dermatologie (1, E), Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie (3, E), Česká gynekologie (4, M, E), Česká a slovenská oftalmologie (1, M, E), Česká a slovenská psychiatrie (1, E), Česká radiologie (1), Česká revmatologie (1, E), Česko-slovenská pediatrie (3, E), Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie (1, M), Klinická biochemie a metabolismus (2, E), Otorinolaryngologie a foniatrie (1, E), Rozhledy v chirurgii (4, M), Vnitřní lékařství (8, M, E). Z těchto 16 časopisů jsou v databázi BMČ indexovány všechny, v databázi Medline 8 a v Embase 13 časopisů. Při hledání RCT v těchto databází bylo zobrazeno 13.0% (indexováno 46), 53.9% (indexováno 26), resp. 57.6% (indexováno 33) manuálně nalezených studií. *Závěr:* Výsledky ukazují současný stav publikování výsledků RCT v rámci časopisů ČLS JEP. Z práce dále jednoznačně vyplývá nutnost lepšího označení RCT v bibliogr. databázích.
Práce byla podporována výzkumným záměrem UK 2. LF č. 111300003.

DYNAMIKA PCR POZITIVITY U PACIENTŮ S INVAZIVNÍM MENINGOKOKOVÝM ONEMONĚNÍM - PRVNÍ VÝSLEDKY

Jindřichová, E.[1,2], Marešová, V.[2], Křížová, P.[1], Kalmusová, J.[1], Džupová, O.[2]

[1] Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy, SZÚ, Praha
[2] 1. infekční klinika Fakultní nemocnice Na Bulovce, Praha
školitel: MUDr. Pavla Křížová, CSc., Doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.
e-mail autora: e.jindrichova@seznam.cz

PCR metoda je stále více používána v diagnostice invazivního meningokokového onemocnění (IMO). Dynamika PCR pozitivity nebyla zatím studována. Uvádíme první výsledky našeho projektu, který je zaměřen na zjištění časové periody po nasazení antibiotické terapie, kdy je DNA *Nesseria meningitidis (N.m.)* ještě detekovatelná v různých klinických materiálech (likvor, krev).

Ve studii jsme vyšetřili 19 pacientů hospitalizovaných na Infekční klinice FNB s laboratorně potvrzenou diagnózou IMO. Likvor byl odebírán v den přijetí a kontrolní vzorek v průběhu hospitalizace podle zdravotního stavu. Vzorky krve byly sbírány od 1. do 7. dne hospitalizace. Isolace DNA jsme prováděli komerčně dostupným Qiagen kitem. Vyšetřili jsem 29 vzorků likvoru a 62 vzorků krve metodou PCR se specifickými primery pro *N.m.* PCR produkty jsme detekovali na 2% gelové elektroforéze.

Likvor: V den přijetí 16 ze 17 vzorků likvoru bylo pozitivních, 6 z nich bylo odebráno po nasazení antibiotické terapie. U 12 pacientů byla provedena kontrolní lumbální punkce: 6 krát s pozitivním a 6 krát s negativním výsledkem. Krev: V den přijetí 9 ze14 vzorků bylo pozitivních, 3 z nich odebrány po zahájení ATB terapie. V kontrolních vzorcích odebraných 3 a více dní po nasazení ATB terapie nebyla DNA *N.m.* detekována.

Ze získaných výsledků usuzujeme, že do 3. dne po nasazení antibiotické terapie je většina vzorků ještě pozitivních. Přetrvávání pozitivity DNA se jeví delší v likvoru. Nejdelší perioda, kdy jsem prokázali etiologické agens byla 7 dní po nasazení ATB terapie. Hodnocení PCR pozitivity má význam pro stanovení správného a spolehlivého diagnostického postupu při podezření na IMO.

INTERHEMISFERÁLNÍ INTERAKCE A ŠÍŘENÍ EPILEPTICKÉ AKTIVITY DETEKOVANÉ METODOU FÁZE/KOHERENCE.

Jiruška P.[1,2], Prokš J.[3]
[1]Ústav fyziologie 2. LF, [2]Klinika dětské neurologie 2. LF
[3]Katedra teorie obvodů FEL ČVUT
školitel: G.Brožek
email:jiruskap@seznam.cz

Jedna z charakteristických vlastností epileptického ložiska je, že se jeho aktivita může propagovat do okolních oblastí mozku, homolaterálních, či kontralaterálních. Může se jednat o aktivitu jak interiktální, tak iktální. Doba propagace epileptické aktivity může trvat několik milisekund, až několik sekund. V případě velmi rychlé propagace je obtížné zrakově rozlišit oblast mozku, ze které aktivita vychází, od oblasti, do které se propaguje. EEG obraz tak může budit dojem, že aktivita se v příslušných elektrodách objevuje simultánně a záznam tak může být mylně interpretován jako synchronní. V tomto případě lze využít k detekci časového zpoždění mezi dvěma signály metody číslicového zpracování. Avšak použití klasických metod měření časového zpoždění, jakými jsou například měření mezivrcholové vzdálenosti, nebo průměrování, může být omezeno v důsledku komplikované morfologie analyzovaných signálů. Tento problém částečně řeší metoda výpočtu fáze/koherence. Tato metoda má dvě varianty. První varianta využívá k výpočtu koherence, fáze a časového zpoždění algoritmus rychlé Fourrierovy transformace. Její nevýhodou je nezbytnost delších segmentů signálu, nebo potřeba průměrování. Alternativou je metoda výpočtu fáze/koherence s pomocí autoregresního modelování, která k získání signifikantních odhadů koherence a fáze nevyžaduje dlouhé úseky signálu.

Tyto metody mají praktické využití v klinické epileptologii. Mohou napomáhat lokalizovat epileptické ložisko, rozlišovat primární a sekundární bilaterální synchronii, či určovat hemisferální predominanci epileptogenicity. Výsledky těchto analýz mohou mít následně efekt na volbu adekvátní farmakoterapie, případně na volbu epileptochirurgického výkonu. Tuto metodu lze také využít v experimentálním výzkumu za účelem pochopení patofyziologických mechanismů epilepsie a mechanismů neuronální synchronizace. Zároveň se jedná o univerzální metodu měření časového zpoždění, kterou lze využít ke zpracování jakéhokoliv signálu, nejenom elektroencefalogramu.

VLIV VIGILITY NA FREKVENCI LÍZÁNÍ U LABORATORNÍHO POTKANA

Jiruška P.[1], Vajnerová O.[1], Bielavská E.[2], Brožek G.[1]
[1]Ústav fyziologie UK 2.LF, [2]Fyziologický ústav AVČR,
školitel:G.Brožek

Lízání je mechanismem příjmu tekutin u laboratorního potkana. Základní rytmus lízání je generován centrální generátorem v mozkovém kmeni. Frekvenci lízání lze ovlivnit změnami v konfiguraci pití. Pokud je konfigurace pití konstantní, frekvence lízání může být do určité míry ovlivněna faktory jakými jsou míra deprivace tekutin, typ roztoku, či fáze pokusu. Cílem této práce bylo prokázat, zda frekvenci lízání laboratorního potkana ovlivňuje úroveň vigility.

Pokusům předcházela fáze spojená s deprivací tekutin. V průběhu pokusu byla zvířata umístěna do boxu s elektrickým senzorem lízání, který umožňoval registraci a výpočet následujících parametrů: interval mezi jednotlivým líznutím (LLI), doba trvání kontaktu jazyka s nástavcem pro vodu (CD) a interval mezi jednotlivými kontakty jazyka s nástavcem (ICI). Zvířata byla rozdělena do dvou skupin. Zvířata ze skupiny S (somnolentní) byla umístěna v klidném prostředí laboratoře a při behaviorálním sledování nevykazovala motorickou aktivitu a dechová frekvence byla nízká (75 dechů/min.). Registrace proběhla v sedmi sezeních v době mezi 9:45 a 13:00. Osmá registrace byla provedena okamžitě po předchozím sezení a před jejím započetím bylo do boxu umístěno další zvíře. Druhá skupina zvířat V (vigilní) byla umístěna v sousední rušné místností. Zaznamenali jsme u nich pohybovou aktivitu a frekvence dechu byla vysoká (nad 130 dechů/min.). Navíc první registraci každého zvířete ze skupiny V předcházel kontakt s jiným zvířetem. Tím byla zajištěna plná vigilita a byla provedena první registrace (kolem 13:00). Před začátkem druhé registrace bylo do boxu umístěno další zvíře.

Výsledky naměřených dat prokázaly, že frekvence lízání byla ovlivněna úrovní vigility. Frekvence lízání ve 13:00 u somnolentních zvířat skupiny S byla 5,96 Hz (LLI 167,9 ms), zatímco u vigilních potkanů ze skupiny V byla frekvence lízání 6,57 Hz (LLI 152,1 ms). V přítomnosti druhého zvířete v boxu došlo u obou skupin ke zvýšení frekvence lízání (skupina S: 6,49 Hz, LLI 154,0 ms; skupina V: 6,82 Hz, LLI 146,6 ms). Z těchto pozorování vyplývá, že úroveň vigility je další faktor, který ovlivňuje frekvenci lízání a měl by být brán v úvahu při experimentech zaměřených na studium mechanismů lízání. Závěrem lze také předpokládat podobný vliv úrovně vigility na jiné centrální generátory.

KVANTITATIVNÍ DETEKCE EXPRESE GENU WT1 U DĚTSKÝCH AKUTNÍCH MYELOIDNÍCH LEUKÉMIÍ: PROGNOSTICKÝ VÝZNAM A SLEDOVÁNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI

Kalinová, M. (1,2), Šrámková, L.(1,2), Hrušák, O. (1,3), Starý, J. (2), Trka, J. (1,2)
(1) CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague; (2) II. DK; (3) ÚI UK 2.LF
školitel: Doc. MUDr. Jan TRKA, Ph.D.
marketa.kalinova@lfmotol.cuni.cz

Význam exprese genu WT1 v maligních myeloblastech není ještě zcela objasněn. Vyšetřovali jsme hladinu exprese WT1 v čase diagnózy akutní myeloidní leukemie (AML) u 47 dětských pacientů pomocí kvantitativní reverzně transkriptázové PCR (RQ-RT-PCR). Nalezli jsme signifikantně nižší hladiny exprese genu WT1 u pacientů s AML M5 (p=0.0015); žádnou spojitost jsme nenašli mezi úrovní exprese WT1 a pohlavím, počtem leukocytů při diagnóze a karyotypem. Naopak statisticky signifikantní korelace existuje mezi nízkou expresí WT1 při diagnóze ($<K562^{-4}$) a vynikající prognózou (EFS 100% vs. 30%; p=0.0014; median sledování = 413 dní). Korelaci jsme také nalezli mezi vysokou iniciální expresí ($>K562^{-2}$) a špatnou prognózou (EFS 16% vs. 66%; p<0.03). Analyzovali jsme expresi genu WT1 v průběhu léčby u 28 pacientů v celkem 222 vzorcích kostní dřeně a porovnávali jsme dynamiku hladin transkriptu WT1 s měřením minimální reziduální nemoci (MRN) pomocí tříbarevné průtokové cytometrie (3-FC). Ze 14 pacientů s vysokou iniciální hladinou WT1 ($>K562^{-2}$; median sledování=531 den) 8 prodělalo relaps onemocnění a u 7 z nich korelovala dynamika exprese genu WT1 s průběhem nemoci a 3-FC. Pět pacientů s trvale nízkou nebo nulovou expresí WT1 a nízkou 3-FC MRN zůstalo v první kompletní remisi. Jeden pacient remise nedosáhl a jeho hladiny WT1 zůstaly trvale vysoké. U dalších 14 pacientů s nízkou iniciální hladinou WT1 nedošlo v průběhu léčby ke změně exprese – dvanáct z nich zůstalo v první remisi a u dvou došlo k relapsu doprovázenému vzestupem 3-FC MRN (median sledování = 642 dny). Podle našich výsledků je sledování exprese genu WT1 pomocí RQ-RT-PCR slibnou alternativou pro sledování MRN u přibližně poloviny dětských pacientů s AML. Význam pro určení prognózy pacientů musí být dále ověřen.

Podporováno granty #9718 FN Motol a #111300005 a #111300003 MŠMT ČR.

EPILEPSIE ZHORŠUJE NĚKTERÉ PŘÍZNAKY PORUCH AUTISTICKÉHO SPEKTRA

R. Kulísek, M. Hrdlička, L. Propper, Dětská psychiatrická klinika FN Motol, 2.LF UK, Praha; V. Komárek, A. Zumrová, L. Faladová, Dětská neurologická klinika FN Motol, 2.LF UK, Praha; M. Blatný, T. Urbánek, Psychologický ústav, Akademie věd ČR, Brno.
Školitel: Doc. MUDr. Vladimír Komárek, Csc. Školitel konzultant: Doc. MUDr. Michal Hrdlička, Csc.

Výskyt epilepsie u autistického spektra poruch je udáván v rozmezí 4,8 – 26,4%. Cílem studie bylo objasnit vztah mezi touto komorbiditou a autistickou psychopatologií. Byl zkoumán soubor 77 pacientů autistického spektra (61 chlapců, 16 dívek) o průměrném věku 9,1±5,3roku. Dle kritérií ICD–10 jsme diagnostikovali 48pacientů s dětským autismem, 19 pacientů s atypickým autismem, 3 pacienty s desintegrační poruchou, 4 pacienty s Aspergerovým syndromem, 3 pacienty s jinou pervazivní vývojovou poruchou. K vyšetření psychopatologického profilu byla použita observační škála CARS a semistrukturované interview ADI–R. Klinické neurologické vyšetření, centrované na zhodnocení epilepsie zahrnovalo také EEG vyšetření. 79,7% pacientů v souboru bylo mentálně retardovaných. Epilepsie se vyskytovala u 17 pacientů (22,1%). Celkové průměrné skóre CARS bylo 37,3±6,7 a nekorelovalo významně s výskytem epilepsie. Přítomnost epilepsie významně kladně korelovala s položkami škály CARS č.2 („Imitace“, p<0,001) a č.7 („Zraková reakce“, p=0,001) a se subškálami dotazníku ADI-R „Neschopnost sdílet vzájemné potěšení (p=0,020), „Neschopnost kompenzovat chybějící jazyk gesty“ (p=0,006) a Chybění spontánní symbolické nebo sociálně napodobivé hry“ (p=0,012). S přítomností epilepsie nekorelovalo žádné z celkových skórů ADI-R. Rozdíl mediánů významně korelujících položek činil 0,75-1bod v případě škály CARS a 2,5-2,75bodu v případě ADI-R.

PREVENTIVNÍ PODÁNÍ ANTIOXIDANTU N – ACETYLCYSTEINU (NAC) BRÁNÍ POŠKOZENÍ PLICNÍCH CÉV CHRONICKOU HYPOXIÍ.

V. Lachmanová, O. Hniličková, J. Herget, Ústav fyziologie, UK 2. LF a Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév, Praha.
Školitel: V. Hampl

Přestavba plicního cévního řečiště při hypoxické plicní hypertenzi je výsledkem poškození stěny periferních plicních cév v časných fázích hypoxie. Poškození je zahájeno uvolněním radikálů kyslíku a/nebo oxidu dusnatého. Abychom vysvětlili úlohu radikálů v patogenezi hypoxické plicní hypertenze, vystavili jsme dospělé samce laboratorních potkanů 5 denní izobarické hypoxii ($FiO_2 = 0,1$) a podávali jsme jim antioxidant (NAC 20g/l ve vodě na pití). NAC byl podáván preventivně (5 dní před začátkem hypoxie), terapeuticky (během hypoxie) nebo v kombinaci (před i v průběhu hypoxie). Kontrolní zvířata byla umístěna v normoxii. U potkanů vystavených hypoxii podání NAC inhibovalo hypoxií indukovaný vzestup nitrotyrosinu v séru. Nitrotyrosin je marker přítomnosti peroxynitritu (produkt interakce NO a superoxidu).Hypoxická zvířata s NAC měla koncentraci nitrotyrosinu 131 ± 12 nM a u hypoxických zvířat bez NAC byla jeho koncentrace 250 ± 36 nM, $p < 0,001$). Plicní hemodynamika byla studována na preparátu izolovaných ventilovaných plic laboratorních potkanů. Plíce byly perfundovány solným roztokem s 4% albuminem. Reaktivita preparátu izolovaných plic na akutní hypoxii (10, 5, 3 a 0% O_2) byla 5 - denní hypoxií potencována a hyperreaktivitě se předešlo podáním NAC. Vztah mezi perfúzním tlakem a průtokem (měření rezistence plicního řečiště) byl chronickou hypoxií posunut směrem k vyšším tlakům, tento posun byl významně menší u skupin zvířat, která dostávala NAC. Preventivní a preventivní + terapeutické podávání bylo účinnější než pouze podávání terapeutické .
Z toho vyplývá, že nárůst kyslíkových radikálů se uplatňuje v patogenezi hypoxické plicní hypertenze. Preventivní podávání antioxidantů brání vzniku hypoxické plicní hypertenze u laboratorních potkanů.

NÁHLÁ ÚMRTÍ KOJENCŮ V ČESKÉ REPUBLICE – EPIDEMIOLOGICKÁ STUDIE

Matějů E., Göpfertová D., Bouška I., Zikmund J., Ústav soudního lékařství 2. LF UK, Praha a Ústav epidemiologie 2. LF UK, Praha
Školitelé: Prof. MUDr. Ivan Bouška, CSc a Doc. MUDr. Dana Göpfertová, CSc.

SIDS, Sudden Infant Death Syndrome = Syndrom náhlého úmrtí kojenců, je stále jedním z nejzáhadnějších úmrtí u dětí do jednoho roku života, neboť jeho příčina není zatím objasněna. Podle celé řady studií je etiologie SIDS multifaktoriální.

Náhlá úmrtí v kojeneckém věku jsou významnou součástí tzv. kojenecké úmrtnosti (tj. úmrtnosti dětí do 1. roku života). Kojenecká úmrtnost je významným demografickým ukazatelem, ve kterém se odráží úroveň celkové zdravotní, sociální a ekonomické situace společnosti.

Tato studie je první sondou do problematiky SIDS v rámci celé České republiky v období let 1999 – 2001. V těchto třech letech zemřelo celkem 557 dětí ve věku 7 dnů až 1 rok života, z celkového počtu 271 096 živě narozených dětí. Z 557 úmrtí bylo 94 náhlých. Ve 14 případech postmortální vyšetření objasnilo příčinu úmrtí. U 80 dětí byla závěrečná pitevní diagnóza SIDS.

V průměru se jednalo o 27 (26,67) případů SIDS za rok a incidence tohoto syndromu na 1000 živě narozených dětí činila 0,30. Tato studie se dále soustředí na epidemiologické aspekty SIDS případů, jako např. sezónnost, den a hodina úmrtí, počet případů SIDS v jednotlivých krajích České republiky.

11β-HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V PLACENTĚ HYPERTENZNÍCH POTKANŮ

Mazancová K., Kuneš J., Mikšík I. a Pácha J.
pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4-Krč
školitel: prof. RNDr.Václav Pelouch, CSc.
e-mail: mazancok@biomed.cas.cz

Studie u normotenzních potkanů ukazují, že nadměrný přísun glukokortikoidů z těla matky do plodu způsobuje hypertenzi v pozdějším věku. Zřejmě je tento jev způsoben sníženou enzymovou aktivitou 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy (11HSD) v placentě. Existují 2 isoenzymy: 11HSD2 katalyzuje oxidaci kortikosteronu na C11, zatímco 11HSD1 katalyzuje redukci. Cílem této práce bylo zjištění možného pozměnění této placentární bariéry u dvou modelů hypertenzních potkanů: spontánně hypertenzní (SHR) a normotenzní (WKY) potkan, Dahlův potkan citlivý (DS) a necitlivý (DR) k zvýšenému příjmu soli.

Real-time RT-PCR analýza prokázala v placentě obě isoformy 11HSD. V expresi mRNA pro 11HSD2 nebyly nalezeny rozdíly mezi jednotlivými kmeny, zatímco exprese 11HSD1 byla 2,4× vyšší u WKY než u SHR a 9,6× vyšší u DS oproti DR. Enzymová aktivita 11HSD2 neukázala žádné rozdíly u studovaných potkanů. Oproti tomu 11-oxoreduktasová aktivita 11HSD1 byla vyšší u WKY a DS než-li u SHR a DR. Net aktivita 11HSD (11β-dehydrogenasová minus 11-oxoreduktasová) byla nižší u DS oproti DR a ukazuje na celkovou dehydrogenaci kortikosteronu.

Tato data prokazují, že 1) v placentě převládá inaktivace kortikosteronu a 2) placentární bariéra pro glukokortikoidy není snížena u SHR oproti normotenzním kmenům WKY, ale je menší u DS nežli u DR potkanů. Tento rozdíl v placentární bariéře u Dahlových potkanů by mohl vést k citlivosti krevního tlaku na zvýšený příjem soli.

CYTOMETRIE DĚTSKÉ AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE

Mejstříková E.[1,2], Kalina T[1,2]., Froňková E.[1,3],Ridošková J.[1,2], Pospíšilová K.[1,2], Trka J.[1,3],Starý J.[3],Hrušák O.[1,2]
[1]CLIP-Childhood Leukemia Investigation Prague, [2]Ústav imunologie a [3]II.dětská klinika LF2 UK a FN Motol
ester.mejstrikova@lfmotol.cuni.cz
školitel: MUDr.Ondřej Hrušák, PhD

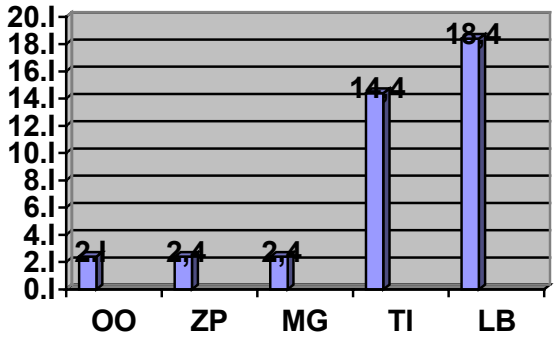
Úvod.Ve stadiu minimální reziduální nemoci (MRN) nenacházíme blasty v optickém mikroskopu. Blasty lze detekovat jen citlivějšími metodami, jakými jsou například průtoková cytometrie nebo polymerasová řetězová reakce (PCR). **Metody.**1.11.2002 byl zahájen protokol pro léčbu dětské akutní lymfoblastické leukémie BFM ALL IC 2002. V rámci něho koordinujeme studii sledování MRN pomocí čtyřbarevné průtokové cytometrie MiniMini. Zároveň naše laboratoře koordinují studii MiniRisk, která sleduje MRN pomocí PCR. U ALL z B řady, resp. T řady měříme čtyři, resp. tři čtyřkombinace protilátek. Tyto kombinace měříme u všech pacientů při diagnóze a ve stanovené dny léčby.**Cíl studie.** Vytvoření standardního nástroje pro sledování MRN pomocí průtokové cytometrie.Stanovení backgroundu pro jednotlivé kombinace v regenerující se dřeni.Zjištění eventuálních rozdílů v imunofenotypu ALL při diagnóze v jednotlivých zemích. Určení pacientů, kteří jsou v protokolu BFMAIEOP léčeni jinak než v protokolu ALL IC. **Výsledky**. Do studie jsme dosud zařadili 23 českých pacientů, 20 pacientů sledujeme pomocí kombinací pro B řadu a 3 pacienty pomocí kombinací pro T řadu. V úvodní fázi léčby je zřetelná změna intenzity exprese antigenů CD20, CD10 a CD34. **Závěr.** Jsme schopni detekovat MRN s citlivostí 10^{-4}. Ke dni odeslání abstraktu jsme vyšetřili 11 vzorků u T ALL a 81 vzorků u B prekurzorové ALL. Vytvořili jsme standardy pro vyhodnocování a srovnávání MRN v nové mezinárodní studii MiniMini, kterou koordinujeme.
Práce byla podpořena VZ MŠ 111300001 a VZ FNM 00000064203.

MORFOLOGICKÉ ZMĚNY OVÁRIÍ U DOSPÍVAJÍCÍCH DÍVEK S POZITIVITOU ATIOVARIÁLNÍCH PROTILÁTEK

Mlčochová Hana, Hořejší Jan, Martínek Jindřich, Leoš Teslík
Klinika dětí a dospívajících UK 2.LF a FNM,Ústav histologie a embryologie UK
Prof. MUDr Jan Hořejší, DrSc.

Předčasné ovariální selhání je onemocnění definované jako nefyziologické ukončení menstruačního cyklu po pubertě a před 40 rokem . Frekvence tohoto onemocnění je asi 1%. Hormonální hladiny vykazují hypergonadotropní hypoestrismus (FSH větší než 40 IU/l). Nástup onemocnění může být pozvolný. Po menarchae a cyklech mohou následovat poruchy cyklu – oligomenorhea až po sekundární amenorheu. Jednou z příčin vzniku předčasného ovariálního selhání je autoimunní poškození ovaria, které může nastoupit kdykoliv od puberty po reprodukční období.
V naší studii jsme provedli výzkum výskytu antiovariálních pprotilátek u pacientek dispenzarizovaných v péči gynekologicko-porodnické kliniky FNM a 2.LFUK pro poruchy menstruačního cyklu a v indikovaných případech, kdy byla provedena biopsie ovarií, jsme sledovali rozvoj autimunního poškození tkáně ovaria u těchto pacientek. Pro srovnání jsme použili kontrolní skupinu zdravých pacientek k zmapování výskytu protilátek u zdravé populace žen v ČR.
Na základě výsledků sledování sérových antiovariálních protilátek, hladin hypofyzárních, ovariálních hormonů a bioptických nálezů lze konstatovat, že je možné s dostatečnou přesností interpretovat aktuální stav neurohumorální regulace, imunní odpověď organismu a také odhadnout stav postižených gonád. Vlastní průběh autoimunitního onemocnění ovaria lze zachytit jen ve vyjímečně, naproti tomu ve všech případech je zřejmá stimulace atretických procesů a to až po úplný deficit rozvoje folikulárního aparátu. Tyto procesy jsou asociovány s fibrotizací stromatu kůry ovaria. Překonání fagocytární ovariální bariery vysvětluje možnost vzniku endogenních antigenních determinant pro protilátkovou odpověď a tedy výskyt sérových antiovariálních protilátek.
Většina pacientek soustředěných v dispenzární péči s ověřeným výskytem antiovariálních protilátek byla léčená náhradní hormonální léčbou. To umožnilo nastartovat zprvu arteficielní cyklické procesy postmenarchálního období. Téměř kompletní úspěšnost zvoleného terapeutického postupu v navození cyklických změn se odrazila i v profilu výskytu antiovariálních

protilátek a ve 28% jejich úplné vymizení po nejméně 6 měsíčním odstupu od úvodního stavu.



OO ooplazma, ZP zona pelucida, MG membrana granuloza, TI theca folliculi interna, LB luteinní buňky

ČASOVÝ PRŮBĚH POŠKOZENÍ MOZKU POTKANA PO OZÁŘENÍ LEKSELLOVÝM GAMA NOŽEM DÁVKOU 50 GY - MRI STUDIE

K.Náměstková, D.Jirák, V.Herynek, M.Burian, Z.Šimonová, R.Liščák, M.Hájek, E. Syková **Ústav neurověd UK 2.LF**
školitelka Prof. E. Syková

Léčba Leksellovým gamma nožem je pro určité indikace neinvazivní alternativa otevřeného neurochirurgického zákroku. V našem pokuse jsme sledovali reakci mozkové tkáně potkana na ozáření in vivo pomocí MRI a testování funkce hippocampu v průběhu 18 měsíců po ozáření. Potkani kmene LE (n=8) byli ozářeni dávkou 50 Gy pomocí 4 isocenter pokrývajících celý hippocampus. Jedenkrát za měsíc byli potkani v isofluranové anestesii sledováni na 4,7 T Bruker MR spectrometru. V intervalech 6, 9, 12 a 16 měsíců po ozáření byli testováni Morrisově vodním bludišti (MWM) kde byla měřena rychlost učení nové pozice ponořeného ostrůvku během 5 dnů. 18 měsíců po ozáření byla zvířata perfundována a řezy mozku byly obarveny kresylovou violetí. Během 6 měsíců po ozáření nebyly pozorovány žádné změny na T2 obrazech, po 7 měsících se vyvinul obraz edému jehož rozsah dosahoval maxima v období 9 až 12 měsíců po ozáření. U poloviny zvířat došlo k významnému zmenšení edému ve 14 měsíci. U zbývající poloviny zvířat signál zvýšeného obsahu vody přetrvával až do 16 měsíce, nález poukazoval na vývoj hydrocefalu. Testování 6 měsíců po ozáření neprokázalo rozdíl mezi výkonem kontrolních zvířat a zvířat ozářených. Po 9-tém měsíci byla pozorována porucha navigace v MWM, která trvala i ve 12 měsíci. Porucha schopnosti učení nastala v období nálezu edému a byla tím závažnější, čím byl edém rozsáhlejší. Histologické zpracovaní po 18 měsících potvrdilo MRI nález. U všech zvířat došlo k redukci objemu corpus calosum (CC). U poloviny z nich byly nalezeny nekrotické změny v oblasti CC, CA1 a přilehlé kůry tvořící kavitu. Naše studie popisuje rozvoj funkční poruchy a morfologických změn mozkové tkáně po ozáření dávkou 50 Gy, která byla doposud považována za subnekrotickou.

Projekt byl podpořen granty *J13/98111300004, LN00A065, AVOZ5039906*

MOŽNOSTI VYUŽITÍ BLOCK DESIGN TESTU V EEG ANALÝZE

NEUSCHLOVÁ L.
Laboratory for Dynamics of Emergent Intelligence, RIKEN Brain Science Institute
Yamaguchi Y.
neuschloval@seznam.cz

Block Design Test je běžnou součástí testovacích škál pro posouzení intelektu a hodnotí schopnost zpracovat vizuálně-prostorovou informaci. Test byl přizpůsoben potřebám EEG analýzy. Účelem této krátké studie bylo zjistit , zdali má mozková činnost při řešení tohoto testu elektrofyziologické koreláty hodnotitelné pomocí EEG analýzy, které by bylo možno studovat prostřednictvím různých obměn testu. To by umožnilo získat podklad pro výzkum pacientů s některými kognitivními poruchami, např. dětským autismem nebo Williamsovým syndromem, kteří vykazují při řešení tohoto testu specifické zvláštnosti.

Metody: EEG data byla získána od pěti pokusných osob. Stimuly byly dvojice obrazců založených na Block Design Testu, promítané z obrazovky počítače. Pro každou ze dvou podmínek bylo použito 100 dvojic, z toho 1/2 stejných a 1/2 odlišných. Ty byly randomizovány. Interstimulační interval byl 3 s. EEG bylo snímáno kontinuálně během celého testu.
Použité analýzy: FFT, Wavelet transform
Výsledky: První výsledky ukázaly aktivitu v pásmu Theta (4-8 Hz) ve fronto-centrální a pravé parietální oblasti s rozdílnou amplitudou v jednotlivých podmínkách.

PŘEHLED VÝSLEDKŮ MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÝCH VYŠETŘENÍ MIKRODELEČNÍCH SYNDROMŮ

Novotná, K., Vlčková, Z., Hrabáková, J., Novotná, D., Krutílková, V., Havlovicová, M., Kočárek., E. Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2LF a FN Motol Školitel: RNDr. E. Kočárek, PhD. e-mail:
kamilka.novotna@seznam.cz

Přednáška shrnuje výsledky molekulárně cytogenetických vyšetření vybraných mikrodelečních syndromů. Na získání dat se v letech 1999-2002 podíleli významnou měrou studenti v rámci grantových projektů FRVŠ. Jednotliví pacienti byli k vyšetření vybráni na základě indikace od klinického genetika, převážně se jednalo o děti do 15 let, v odůvodněných případech byli vyšetřeni také starší osoby. Vyšetřovaným materiálem byly lymfocyty periferní krve, v případě prenatálních vyšetření buňky plodové vody. Analýzu mikrodelecí jsme prováděli metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s využitím komerčně dodávaných lokus - specifických sond firem od Cytocell a Vysis. V prezentaci se zaměřujeme zejména na výsledky vyšetření syndromu Williams-Beuren, asociace CATCH 22, syndromu Smith-Magenis a syndromu Miller Dieker. Syndrom Williams-Beuren je v 95% případů podmíněn mikrodelecí chromozomu 7q11.23. Vyšetřili jsme 15 pacientů s klinickým podezřením na tento syndrom, zmíněnou mikrodeleci se nám podařilo prokázat u 6 (tj. 40%) pacientů. U asociace CATCH22 prokazujeme mikrodeleci chromozomu 22q11.2, která je molekulárně cytogeneticky zjistitelná asi u 90% pacientů s fenotypickými znaky syndromu DiGeorge. Z vyšetřených 197 pacientů se nám podařilo prokázat přítomnost mikrodelece 22q11 u 53 osob; její záchyt tedy činí 27%. Podařilo se nám vyšetřit i 6 případů familiárního výskytu, kde byla mikrodelece chromozomu 22q11.2. nalezena u některého z rodičů nebo sourozenců. U většiny těchto případů se projevuje nápadná variabilita fenotypu, neboť neboť postižení rodičů s prokázanou mikrodelecí 22q11 je zpravidla méně závažné než u jejich dětí se stejnou aberací. Upozorňujeme i na případ diskordantního fenotypu u jednovaječných dvojčat, která, ačkoli jsou nositeli téže mikrodelece, se liší typem a klinickou závažností srdeční vady i dalšími fenotypovými znaky. Syndrom Smith-Magenis je podmíněn mikrodelecí chromozomu 17p11.2. Vyšetřili jsme 10 pacientů, z nich pouze u jednoho byla tato mikrodelece prokázána. Syndrom Miller-Dieker jsme dosud vyšetřovali pouze u 4 pacientů, avšak ani v jednom případě jsme mikrodeleci chromozomu 17p13.3 neprokázali. Naše práce byla finančně podpořena především granty FRVŠ 1399/G3 a 2482/2002, dále pak grantem IGA6912-4 a výzkumným záměrem UK 2.LF č.111300003.

VÝUKOVÝ PROGRAM CYTOGENETIKY PRO STUDENTY

Pánek, M., Hrabáková, J., Kočárek, E.
Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2.LF
Školitel: RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.

Téměř v každém oboru se studenti i vyučující potýkají s nedostatečnými studijními materiály. Studenti se poté musí spoléhat na dostatečný výklad svých pedagogů, popř. na materiály, které pedagog z vlastní iniciativy připravuje a rok co rok obnovuje, aby předávané informace byly stále aktuální. Výuka lékařské biologie v druhém a hlavně ve třetím semestru, jakož i výuka genetického poradenství a klinické cytogenetiky ve čtvrtém ročníku, není výjimkou. I zde chybí kvalitní aktuální materiály, které by dostatečně popisovaly jednotlivé vyšetřovací metody používané v cytogenetice. Některé běžnější metody, jako např. PCR, jsou srozumitelnou formou v dostupné literatuře vysvětleny. Na druhé straně jsou metody nedostatečně vysvětlené. Mezi ně patří bezesporu metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Proto jsme se rozhodli využít moderních komunikačních prostředků a vytvořit pro studenty nový výukový program. Systém využívá jednoduchosti a dostupnosti WWW stran a je rozdělen na dvě části. V první z nich se studentům a všem zájemcům o danou metodu dostane uceleného výkladu se spoustou grafických prvků a názorných schemat. Druhá část je koncipována jako test, kterým si kdokoliv může své znalosti o metodě FISH ověřit. Pro případné zájemce je první část systému připravena i pro stažení v podobě prezentace pro Power Point. Předkládanou prací se snažíme metodu FISH přiblížit co největšímu počtu studentů i zájemců z řad odborné i laické veřejnosti. Celý program je dostupný na adrese http://atlas.vscht.cz. Předpokládáme, že náš výukový program bude v budoucnosti dále rozšiřován tak, aby obsáhl celou tématickou šíři cytogenetických poznatků, které se na lékařských fakultách probírají. Práce byla zčásti finančně podpořena granty FRVŠ 2482/2002 a IGA6912-4 a výzkumným záměrem UK 2.LF č.111300003.

ZVÝŠENÍ ÚČINKU DNA VAKCÍN POMOCÍ KONSTRUKCE NOVÝCH FÚZNÍCH GENŮ

Dana Pokorná[1], Michal Šmahel[1], Noemi Čeřovská[2], Tomáš Moravec[2], Helena Synková[2] a Jiří Velemínský[2], *[1]Ústav hematologie a krevní transfúze, Oddělení experimentální virologie, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2, [2]Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6*, e-mail : danap@uhkt.cz

DNA vakcíny pro léčbu cervikálního karcinomu jsou založeny především na modelovém antigenu E7 lidského papilomaviru typu 16 (HPV16). Imunogennost E7 genu již byla zvýšena konstrukcí různých fúzních genů, např. Sig/E7/LAMP-1 chiméry (Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1995, 92:11671-5). LAMP-1 (lysosome-associated membrane protein) sfúzovaný s E7 umožňuje vstup E7 do endosomálního a lysosomálního kompartmentu, což se projevuje ve zvýšené prezentaci E7 antigenu molekulami MHC II. Ke zvýšení bezpečnosti tohoto fúzního genu jsme vnesli tři bodové mutace do pRb-vazebného místa E7. Immunogennost DNA vakcíny s výsledným Sig/E7GGG/LAMP-1 genem byla obdobná jako u Sig/E7/LAMP-1. Dále jsme fúzovali E7 a E7GGG antigeny s myším proteinem teplotního šoku (HSP). Fúzní geny E7/HSP a E7GGG/HSP vyvolávaly u imunizovaných myší E7-specifické imunitní odpovědi vyšší než samotné E7, E7GGG, a HSP70 geny. Další fúzní gen L2/CP/E7, který obsahuje neutralizační epitop kapsidového proteinu L2 viru HPV16 fúzovaný s obalovým proteinem (CP) viru brambor (PVA) a s HPV16 E7 epitopem, vykazoval zvýšenou imunogennost ve srovnání s E7 a CP/E7. CP fúzní proteiny, stejně tak jako CP samotný, se spontánně skládají do virus-like particles (VLP). L2 epitop se váže na neznámý buněčný povrchový receptor (Kawana et al., *J. Virol*, 2001, 75:2331-6). Účinek DNA vakcín byl ověřen na dvou buněčných liniích transformovaných HPV16 s různou úrovní povrchové exprese MHC I molekul: TC-1 buněčná linie připravená Linem a spol. (*Cancer Res.,* 1996, 56:21-6), která je MHC I pozitivní a od ní odvozený TC-1/A9 klon s redukovanou povrchovou expresí MHC I, který byl vytvořen v naší laboratoři. Ztráta MHC I exprese byla spojena se zvýšenou rezistencí TC-1/A9 buněk k DNA vakcinaci namířené proti E7 antigenu (Šmahel et al., *Vaccine*, 2003, 21:1125-36). Myši byly imunizovány intradermálně genovou pistolí 1 □g každého plazmidu. V preventivním uspořádání (imunizace/challenge) i v terapeutickém uspořádání (inokulace nádorových buněk/imunizace) pokusu byl výskyt i růst TC-1 nádorů signifikantně nižší u myší imunizovaných L2/CP/E7, o něco méně u myší imunizovaných E7/HSP, E7GGG/HSP a Sig/E7GGG/LAMP-1 ve srovnání s E7, nebo

E7GGG. V preventivním uspořádání pokusu nebyla zjištěna žádná ochrana proti TC-1/A9 nádorům při imunizaci E7/HSP, E7GGG/HSP, Sig/E7GGG/LAMP-1. Z výsledků je patrné, že fúze HSP nebo L2/CP s antigenem jsou dvě nadějné strategie pro zvýšení účinku vakcín.

VLIV IMUNOMODULAČNÍCH GENŮ NA ZVÝŠENÍ ÚČINKU DNA VAKCÍN PROTI NÁDOROVÝM BUŇKÁM EXPRIMUJÍCÍCH HPV16 E7 S RŮZNÝM STUPNĚM EXPRESE MHC I.

Dana Pokorná, Michal Šmahel, Pavel Jinoch, Vojta Šroller, Olga Janoušková, Pavel Otáhal, Jitka Kryštofová, Ústav hematologie a krevní transfuze, Oddělení experimentální virologie, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2, e-mail : danap@uhkt.cz

Lidské papilomaviry (HPV) jsou primárním etiologickým faktorem pro vznik cervikálního karcinomu (CC). Nejrozšířenějším typem je HPV16, který byl nalezen u 50% pacientek s CC. Terapeutické anti-HPV vakcíny jsou založeny na virových proteinech E7 a/nebo E6, které jsou nezbytné pro vznik a přetrvávání maligní transformace a které jsou jedinými virovými proteiny, které jsou konstitutivně exprimovány v buňkách CC. Imunogennost E7 proteinu již byla zvýšena konstrukcí Sig/E7/LAMP-1 chiméry (Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 1995, 92:11671-5). Pro zvýšení bezpečnosti tohoto fúzního genu jsme vnesli tři bodové mutace do pRb-vazebného místa E7. Imunogennost DNA vakcíny s výsledným Sig/E7GGG/LAMP-1 genem byla obdobná jako u Sig/E7/LAMP-1. Terapeutický účinek DNA vakcín byl hodnocen na dvou buněčných liniích transformovaných HPV16 s různou úrovní exprese MHC I na povrchu buněk : TC-1 buněčná linie připravená Linem a spol. (Cancer Res. 1996, 56:21-6), která je MHC I pozitivní, a od ní odvozený TC-1/A9 klon se sníženou povrchovou expresí MHC I, který byl vytvořen v naší laboratoři. Ztráta MHC I exprese byla spojena se zvýšenou rezistencí TC-1/A9 buněk vůči DNA vakcinaci namířené proti E7 antigenu. Aby jsme dále zvýšili protinádorový účinek Sig/E7GGG/LAMP-1 genu, kombinovali jsme tento gen s jedním z imunomodulačních genů (IMG) kódujících : myší Hsp70.1 (mHsp70.1), mGM-CSF, lidský MCP-1 (hMCP-1), hFlt-3L, mIL-2, mIL-12, nebo mB7-1. Myši byly imunizovány dvakrát intradermálně (i.d.) genovou pistolí (gene gun) 1 □g každého plazmidu. Ve všech kontrolních skupinách, kde myši obdržely pouze plazmidy s IMG, se neprojevil žádný protinádorový účinek. V pokusu, kdy inokulace nádorových buněk předcházela imunizaci (tzv. terapeutické uspořádání), byla incidence a růst TC-1 nádorů snížena u myší léčených kombinací Sig/E7GGG/LAMP-1 a hFlt3-L, mIL-12, nebo mB7-1. V pokusu s preventivním uspořádáním, kdy po imunizaci následovala challenge nádorovými buňkami TC-1/A9, bylo nejvyšší ochrany před vznikem TC-1/A9 nádorů dosaženo při imunizaci Sig/E7GGG/LAMP-1 v kombinaci s mGM-CSF nebo mIL-12. Z výsledků lze vyvodit, že zatímco mIL-12 vyvolával E7-specifickou protinádorovou imunitu proti MHC I pozitivním i negativním nádorovým buňkám, vliv hFlt-3L, mGM-CSF, a mB7-1 byl závislý na stupni MHC I exprese na povrchu nádorových buněk a/nebo na uspořádání imunizačního schématu.

PROBLEMATIKA MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉHO VYŠETŘENÍ MOZAIKOVÝCH FOREM GONOZOMÁLNÍCH ANEUPLOIDIÍ

Polochová, R., Travníčková, S., Vlčková, Z., Novotná, K., Malíková, M., Havlovicová, M., Kočárek, E.

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a UK 2.LF
Školitel: RNDr.Eduard Kočárek,PhD.

Ve své přednášce prezetuji výsledky vyšetření 16 pacientů, u nichž se na základě běžného cytogenetického vyšetření předpokládal výskyt gonozomální aneuploidie v mozaice. Cytogenetický nález srovnávám s výsledkem molekulárně cytogenetického vyšeření, k němuž jsem použila fluorescenčně značené satelitní sondy hybridizující s chromozomy X a Y. Ve srovnání s klasickou cytogenetickou analýzou umožňuje metoda FISH rozbor nesrovnatelně většího počtu buněk, z čehož také plynou určité diskrepance mezi výsledky těchto vyšetření. Určitým problémem metody FISH je však možnost výskytu nespecifických hybridizačních signálů, které se mohou projevit zejména při analýze interfázních jader a vést tak k falešně pozitivním výsledkům. V prezentaci se proto snažím nastínit kritéria, podle nichž by bylo možno výsledky molekulárně cytogenetického vyšetření co nejspolehlivěji interpretovat. V další části práce se blíže zabývám případy některých konkrétních pacientů a srovnávám jejich fenotyp se zjištěným molekulárně cytogenetickým nálezem. Práce byly zčásti finančně podpořeny granty FRVŠ 2482/2002 a IGA6912-4 a výzkumným záměrem UK 2.LF č.111300003.

UČEBNICOVÉ DOGMA PADLO – T-BUNĚČNÝ RECEPTOR JE PŘESTAVĚN U NORMÁLNÍCH B LYMFOCYTŮ

Prouzová Zuzana (1,5), Krejčí Ondřej (1), Horvát Ondřej (4), Trka Jan (1,2) a Hrušák Ondřej (1,3)
(1), CLIP – Childhood Leukemia Investigation Prague, (2), 2. dětská klinika UK 2.LF, (3), Ústav imunologie UK 2.LF, (4), Ústav molekulární genetiky AV ČR, (5), UK 2.LF – 5. ročník
ŠKOLITEL: MUDr. Ondřej Krejčí
e-mail: zuzan_p@centrum.cz

Velká diversita T i B lymfocytů vzniká na základě přestavby genů pro T buněčné receptory (TCR), respektive imunoglobuliny (Ig). Během přestavby těchto genů dochází k rekombinaci genových segmentů V(D)J. T i B lymfocyty využívají k uskutečnění přestavby stejný enzymový systém a rozhodnutí o tom, zda dojde k přestavení genu TCR nebo Ig, závisí na regulačních systémech. V literatuře a učebnicích se uvádí, že gen TCR je přestavěn výhradně u T lymfocytů. Zároveň je dlouho známa skutečnost, že tento gen bývá často přestavěn u leukemických blastů B-prekursorových ALL. Pomocí separace na průtokovém cytometru, kvantitativní PCR v reálném čase, polyakrylamidové elektroforézy a sekvenace amplifikovaných produktů jsme analyzovali potenciální přítomnost přestaveb genu TCR delta v normálních B lymfocytech. Zjistili jsme, že v periferních B lymfocytech získaných od zdravých dárců se vyskytují nekompletní přestavby V2-D3 a D2-D3. V 6-ti vyšetřených vzorcích dosahovala četnost výskytu obou přestaveb až 16% všech vyšetřených alel. Tyto výsledky tak vyvracejí tvrzení, že gen TCR je přestavěn výhradně u T lymfocytární linie a otvírají zároveň další otázky: v jakém rozsahu dochází ve zdravých B buňkách k přestavbám genu TCR, resp. přestavbám Ig v T buňkách, v jakých buněčných subtypech k přestavbám dochází a jaký je fyziologický významu vzniku přestavby pro vývoj B nebo T lymfocytu.
Podporováno VZ: #111300003 a #111300001 MŠMT.

DISTÁLNÍ DĚDIČNÁ MOTORICKÁ NEUROPATIE (HMN II) - KLINICKÝ OBRAZ ONEMOCNĚNÍ U ROZSÁHLÉ ČESKÉ RODINY

M. Redlová[1], P. Seeman[2], R. Mazanec[1], J. Haberlová[2], M. Bojar[1], J. Irobi, E. Nelis[3], P. De Jonghe[3], V. Timmerman[3]

1-Neurologická klinika UK 2.LF, FNM, 2- Dětská neurologická klinika UK 2.LF, FNM, 3-Molecular Genetics Department, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, University of Antwerp, Antwerpen, Belgium

Dědičné motorické neuropatie (HMN) jsou skupinou onemocnění projevující se slabostí a atrofií distálního svalstva končetin bez současného senzitivního deficitu. Autoři prezentují případ rozsáhlé české rodiny s autozomálně dominantní HMN s postižením 33 osob v šesti generacích. V současné době je vyšetřeno 16 postižených. Onemocnění začíná ve věku mezi 12 až 28 let oslabením extenzorů prstů dolních končetin. Příznaky onemocnění postupně progredují od slabosti až po chabou plegii dolních končetin, 3 postižení byli připoutáni na invalidní vozík ve věku mladším než 50 let. Horní končetiny jsou postiženy později a stupeň postižení je mírnější. Časnější nástup obtíží je spojen se závažnějším handicapem v budoucnu.
Dle provedené DNA vazebné analýzy byla prokázána vazba na 12. chromozom, na oblast, která byla již dříve zmapovaná u belgické rodiny s postižením HMN typu II
(Timmerman et al., Hum. Mol. Genet., 1996;5:1065-1069). Další genetické vyšetření české rodiny dává možnost zredukovat lokus obsahující gen, jehož mutace je zodpovědná za vznik onemocnění, z rozsahu 5Mb na 1,8Mb.

Podpořeno z grantu IGA NF 6504-3, VZ 111300003 a ENS

L-ASPARAGINASA A JEJ VZŤAH K EXPRESII GÉNU ASPARAGIN SYNTETÁSY

J.Starková (1), O.Krejčí (1), B.Otová (4), J.Madžo (1,5), O.Hrušák (1,3), J.Trka (1,2)
(1) CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague; (2) II. DK; (3) ÚI UK 2.LF; (4) UK 1.LF; (5) ÚF UK 2.LF
školitel: Doc. MUDr. Jan TRKA, Ph.D.
julia.starkova@lfmotol.cuni.cz

Genotypicky definovaná skupina TEL/AML1[+] akútnych lymfoblastických leukémií (ALL) je charakterizovaná vyššou citlivosťou k cytostatiku L-asparaginasa (Asnase) a lepšími výsledkami liečby. Na základe antagonistického vzťahu asparagin syntetásy (AsnS) a Asnase sme v *in vitro* podmienkach sledovali zmeny expresie génu AsnS u bunkovej línie TEL/AML1[+] (REH) a porovnali ich s bunkovou líniou TEL/AML1[-] (Nalm-6) a normálnou lymfoblastoidnou líniou (NC-NC). Bazálnu a indukovanú expresiu AsnS sme detekovali pomocou RQ-RT-PCR v časových intervaloch 3, 6, 9, 12 hodín bez/s Asnase [4U/ml]. Bazálna hladina kontrolnej skupiny REH a NC-NC buniek bola 3.8 a 3.9 krát nižšia ako u Nalm-6 línie. Výsledné hodnoty expresie AsnS boli závislé len na bazálnej hladine, indukcia po podaní Asnase bola zhodná u všetkých línií. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že neexistuje priamy vzťah medzi AsnS a zvýšenou citlivosťou TEL/AML1[+] buniek na Asnase. AsnS expresiu sme porovnávali u pacientov s následným relapsom a bez relapsu v TEL/AML1[+] a TEL/AML1[-] skupinách. TEL/AML1[+] pacienti s relapsom mali signifikantne zníženú expresiu pri diagnóze (median=0.261) v porovnaní s pacientmi, ktorí zostali v kompletnej remisii (n=20; median=0.823). Podobné výsledky u ostatných ALL pacientov neboli pozorované. Ďalej sme preukázali, že dlhodobá kultivácia TEL/AML1[+] buniek s Asnase vedie k zástave bunkovej proliferácie, pričom u TEL/AML1[-] buniek sa proliferačná aktivita zachovala. To sme potvrdili aj pri analýze bunkového cyklu, kde REH bunky sa kumulovali v G1/G0 fáze a naproti tomu Nalm-6 bunky prechádzali do G2/M fázy a naďalej sa delili. Predpokladáme, že Asnase, ktorá depletuje Asn a Gln z média vyvoláva nutričný stres, na základe ktorého TEL/AML1[+] bunky na rozdiel od TEL/AML1[-] zastavujú svoju proliferáciu.

Podporované grantmi #57 GAČR a #111300003 a #111300001 MŠMT ČR.

ÚLOHA VÁPNÍKU UVOLNĚNÉHO SE SARKOPLAZMATICKÉHO RETIKULA V HYPOXICKÉ PLICNÍ VAZOKONSTRIKCI U MLÁĎAT POTKANŮ.

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

Hypoxická plicní vasokonstrikce je lokální plicní regulační mechanizmus distribuce průtoku krve plícemi, který brání vzniku arteriální hypoxémie při nerovnoměrné ventilaci plic. Hypoxická plicní vasokonstrikce je zprostředkována zvýšením intracelulární koncentrace vápníku. Baňasová a spol. ukázali, že na změnách intracelulárního vápníku při hypoxické plicní vasokonstrikci podílí zvýšení aktivity Ca ATP asy sarkoplasmatického retikula (SERCA). Efekt byl přítomen u samic a nepřítomen u samců potkanů (Baňasová A, a spol. *Physiol. Res.*, 2002, p. 71P). Abychom blíže ozřejmili význam pohlaví pro úlohu SERCA v hypoxické plicní vazokonstrikci studovali jsme vliv tapsigarginu na hypoxickou plicní vazokonstrikci a na vazokonstrikci vyvolanou podáním 0,05 mg angiotensinu II (AII) u pohlavně nezralých mláďat samců potkanů (tělesná váha 48 – 100g).

K pokusům byl použit preparát izolovaných plic perfundovaných solným roztokem s 4% albuminu. Produkce NO a prostaglandinů byla zablokována 50 mM LNAME a 17 mM meklofenamatu. Plíce byly ventilovány vzduchem s 5%CO_2, hypoxie byla navozována ventilací směsi 3%0_2+5%CO_2+92%N_2. U 7 preparátů byl podán tapsigargin 10^{-9}M rozpuštěný v DMSO, v 5 preparátech samotné DMSO.

Podání tapsigarginu i samotného rozpustidla DMSO signifikantně inhibovalo hypoxickou plicní vazokonstrikci, velikost inhibice se nelišila. Vazokonstrikce vyvolaná AII byla tapsigarginem potencována, DMSO ji neovlivnilo.

Závěr: Byla zavedena metoda studia izolovaných plic mláďat potlanů. Snížení hypoxické vazokonstrikce po blokádě SERCA, pozorované u krysích samic, je nepřítomno jak u dospělých tak u pohlavně nezralých samců potkanů a tedy nesouvisí s produkcí mužských pohlavních hormonů.

CHRONICKÁ HYPOXIE ZVYŠUJE KONCENTRACI OXIDU DUSNATÉHO VE VYDECHOVANÉM VZDUCHU

Šnorek, M., Zdařil, P., Miková, D.
Ústav fyziologie, Univerzita Karlova 2. lékařská fakulta, Praha
Školitel: Prof.RNDr.Václav Hampl, DrSc.
e-mail: michal.snorek@lfmotol.cuni.cz

Oxid dusnatý (NO) je důležitý endogenní působek ovlivňující tenzi a proliferaci hladkého svalu. Jeho zvýšená produkce v plicích při chronické hypoxii pravděpodobně moduluje rozvoj plicní hypertenze. Není ovšem jasné, zda tvorba NO stoupá až po delší hypoxii (pak by mohlo jít spíše o důsledek plicní hypertenze) anebo již v počátcích expozice (pak by se NO mohl podílet na vzniku plicní hypertenze). V této studii jsme proto měřili časový průběh změn koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu u laboratorních potkanů během měsíční expozice hypoxii a v průběhu následujícího zotavení v normoxii.

Dospělí samci potkana kmene Wistar byli vystaveni hypoxii (10% O2) po dobu 26 dní. Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu byla první dva týdny měřena každý den. Během posledních 2 týdnů hypoxické expozice byla frekvence měření menší. Po návratu do normoxie byla produkce NO měřena opět každý den. Při každém měření byly potkani přeneseni z hypoxické komory a umístěni do vzduchotěsné nádoby a po 15 minutách byla změřena koncentrace vydýchaného NO a potkani byli vráceni do hypoxické komory. Vydechované NO bylo měřeno odběrem vzorků vzduchu ze vzduchotěsné nádoby do CLD 77 AM chemiluminiscenčního analyzátoru (EcoPhysis, Duernten, Switzerland).

Produkce NO rostla dramaticky během prvních 5 dní expozice hypoxii (z 0,9 ± 0,2 na 4.0 ± 0,4 ppb/min). S pokračující hypoxií se produkce NO pohybovala na poměrně stálé hladině vyšší než při normoxii (2,4 ± 0,5 ppb/min 11. den; 2,5 ± 0,6 ppb/min 18. den). Po ukončení hypoxické expozice začala produkce NO okamžitě klesat a do 4 dnů se vrátila na úroveň před umístěním potkanů do hypoxie (0,8 ± 0,1 ppb/min).

Naše výsledky ukazují, že chronická hypoxie zvyšuje koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu u potkanů. Po návratu potkanů do normoxie koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu klesla na původní hladinu. Růst produkce NO je nejvýraznější během prvního týdne hypoxie. NO může modulovat rozvoj plicní hypertenze od samého počátku expozice hypoxii.

INTRAKRANIÁLNÍ EPENDYMOMY DĚTSKÉHO VĚKU:VÝZNAM HISTOLOGICKÝCH A IMUNOHISTOCHEMICKÝCH FAKTORŮ A PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE PRO STANOVENÍ PROGNÓZY

[1]Šnuderl M., [1]Zámečník J., [2]Eckschlager T., [2]Cháňová M., [3]Tichý M., [1]Kodet R.,*[1]Ústav patologie a molekulární medicíny, [2]Klinika dětské onkologie, [3] Neurochirurgické oddělení, UK 2. LF a FN v Motole, Praha*

školitelé: MUDr. Josefa Zámečník a ve spolupráci s Prof. MUDr. R. Kodetem.

Úvod: Korelace histologických znaků s průběhem a prognózou je u ependymomů dětského věku nepřesná. **Cíl:** Navrhnout schéma pro zpřesnění prognózy na podkladě hodnocení histologických a imunohistochemických znaků a výsledků průtokové cytometrie. **Metodika**: Studie zahrnuje 31 případů diagnostikovaných v období 1985-1995. Ependymomy byly klasifikovány podle WHO-klasifikace na grade 2 (n = 11) a anaplastické ependymomy (grade 3, n = 20). Semikvantitativně jsme hodnotili 9 histologických znaků, kvantitativně buněčnost a mitotickou aktivitu (MA). Imunohistochemicky jsme sledovali reakce s protilátkami proti markerům kinetiky buněčné proliferace (Ki-67, topoizomeráza II-α, cyclin D1), proteinům podílejícím se na regulaci apoptózy (bcl-2, caspase 3), onkoproteinu p53, GFAP, epiteliálnímu membránovému antigenu (EMA) a cytokeratinu (CK). Průtokovou cytometrií jsme stanovili proliferační frakce a DNA-ploidii nádorových buněk. Výsledky byly statisticky korelovány ve vztahu k přežití nemocných. **Výsledky**: Z klinických parametrů ovlivňovala přežití pouze radikalita chirurgické resekce, ze sledovaných histologických znaků zvýšená buněčnost (>300 buněk/high power field (HPF)), zvýšená MA (>7 mitóz/10HPF). Markery buněčné proliferace (vyjádřené procentem pozitivních buněk – labeling index (LI)) mimo cyclinu D1 korelovaly signifikantně mezi sebou i s prognózou pacientů. Imunoexprese p53 nebo bcl-2 byla signifikantním znakem horší prognózy. U všech ostatních sledovaných znaků jsme žádnou asociaci s biologickým chováním a prognózou nepozorovali. **Závěr**: Navrhujeme následující schéma pro stanovení nepříznivé prognózy u intrakraniálních ependymomů dětí: p53 pozitivita a/nebo Ki- 67 LI>15% (při úplné resekci) nebo
Ki- 67 LI>5% (při subtotální resekci).

Podpora projektu: VZ FNM 000 00064 203, GAČR 301/001394, VZ MŠMT 111300005, 111300004

MORFOLOGICKÉ A FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY PROCESU MATURACE DENDRITICKÝCH BUNĚK A JEJICH VÝZNAM PRO ZAHÁJENÍ IMUNITNÍ REAKCE

R.Špíšek, D.Cebecauerová, A.Šedivá, J.Bartůňková
Ústav imunologie, UK 2.LF

Dendritické buňky (DC) se v organismu vyskytují ve dvou funkčních stádiích označovaných jako nezralé a zralé. Pouze zralá DC je schopna zahájit primární imunitní reakci, zatímco nezralá DC se zřejmě aktivně podílí na zajištění mechanismu periferní tolerance. Proces zrání je in vivo indukován součástmi patogenů, cytokiny a aktivovanými lymfocyty. V této studii jsme studovali charakteristiky procesu maturace na in vitro modelu aktivace DC pomocí první stimulace syntetickou dvojvláknovou RNA a následné reaktivace signály pocházejícími z aktivovaných T lymfocytů- CD40L a IFN gamma. Již krátkodobá aktivace DC byla dostatečná k zahájení ireverzibilního procesu fenotypické maturace, který dále pokračuje nezávisle na další přítomnosti iniciálního stimulu. Krátkodobě aktivované DC však během prvních 48 h aktivace produkují méně IL-12, než buňky stimulované kontinuálně po dobu 48 h. Ačkoli obě skupiny aktivovaných DC (stimulované 4h nebo 48 h) mají po 48 h stejný fenotyp typický pro zralou DC, pouze buňky iniciálně stimulované méně než 8 h si zachovávají schopnost odpovědi na další aktivační signály dodané aktivovanými T lymfocyty. Ukazujeme, že buňky stimulované kratší dobu jsou účinějšími aktivátory T lymfocytů a indukují polarizovanější Th1 typ imunitní reakce. Získané výsledky naznačují, že doba stimulace DC maturačními stimuly dovoluje regulovat typ indukované imunitní reakce pomocí rozdílného ovlivnění fenotypické a funkční maturace. Námi prezentovaný model napodobuje podmínky in vivo a na základě výsledků je tedy možno navrhnout obecný model zahájení imunitní reakce pomocí DC, který bude na konferenci demonstrován. V neposlední řadě jsou prezentované výsledy přínosné pro protokoly používané pro přípravu protinádorových vakcín založených na dendritických buňkách.

VÝZNAM SLEDOVÁNÍ MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI PŘED TRANSPLANTACÍ HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK U DĚTÍ S AKUTNÍ LYMFOBLASTICKOU LEUKÉMIÍ

Šrámková Lucie[1,2], Krejčí Ondřej[1,2], Mužíková Kateřina[1,2], Kalinová Markéta[1,2], Zörnerová Tereza[1,2], Trka Jan[1,2]

[1] CLIP- Childhood Leukaemia Investigation Prague, Laboratoř molekulární genetiky, II. dětská klinika, UK 2.LF a FN Motol
[2] II. dětská klinika, UK 2.LF a FN Motol
Školitel: doc. MUDr. J. Trka PhD.

Hladina minimální reziduální nemoci (MRN) je důležitým prognostickým znakem u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), kteří jsou indikováni k allogenní transplantaci kmenových buněk krvetvorby (SCT). Retrospektivní analýza několika menších skupin pacientů prokázala, že pacienti s ALL, kteří vstupující do předtransplantační přípravy s vysokými hladinami residuální nemoci, mají signifikantně více relapsů a tedy horší prognózu než pacienti MRN negativní. Pro kvantitativní detekci MRN je využívána metodika detekce přestaveb imunoreceptorových genů (IRG) – genů pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinů (Ig) a T-buněčných receptorů (TCR), klonalita produktů se ověřuje pomocí analysy heteroduplexů a následně se provádí kvantitativní PCR v reálném čase s použitím "konsensus" sondy a primeru a druhého primeru specifického pro konkrétního pacienta. Vzhledem k relativně malému počtu těchto pacientů vznikla mezinárodní skupina ESG-MRD (European Study Group for Minimal Residual Diasease), která standardizovala detekci MRN a provádí prospektivní sledování hladiny MRN před a po transplantaci. Česká pracovní skupina dosud do studie zařadila 14 dětských pacientů s ALL, kteří byli indikováni k SCT. U 12 pacientů byla nalezena přestavba IRG vhodná ke sledování MRN, 4 pacienti jsou v současné době sledováni pomocí dvou cílů, 8 pacientů pomocí jednoho cíle. U pacientů s BCR-ABL přestavbou provádíme též kvantitativní detekci transkriptu BCR-ABL. Ve skupině pacientů s nízkou MRN (n=9) jsme zaznamenali pouze jeden potransplantační relaps, ve skupině s vysokou MRN (n=5) prodělali 3 pacienti potransplantační hematologický relaps, 1 pacient molekulárně genetický relaps a 1 zemřel na potransplantační komplikace. Přežití pacientů s vysokou předtransplantační MRN je signifikantně horší než pacientů, kteří vstupují do transplantace s nízkou MRN.

FALEŠNÁ NEGATIVITA MOLEKULY CD8 U AUTOIMUNITNÍHO LYMFOPROLIFERATIVNÍHO SYNDROMU

Virtová M.[1,2], Smíšek P.[3], Špíšek R.[1,2], Mužíková K.[1,3], Starková J.[1,3], Křepelová A.[4], Hrušák O.[1,2]
[1]CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) – společná pracovní skupina Laboratoře molekulární genetiky II. dětské kliniky a Ústavu imunologie UK 2.LF
[2]Ústav imunologie UK 2.LF a FN Motol
[3]II. dětská klinika FN Motol
[4] Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2.LF a FN Motol
školitel: MUDr. Ondřej Hrušák, Ph.D.
email:martina.virtova@lfmotol.cuni.cz

Úvod: Autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (ALPS) je onemocnění, které vzniká v důsledku poruchy apoptózy lymfocytů. U části pacientů se jedná o důsledek mutace genu kódujícího receptor Fas. Charakteristické je vyšší zastoupení subpopulace lymfocytů, které exprimují $\alpha\beta$ T-buněčný receptor, ale nenesou CD4 ani CD8 receptor. **Metody:** Pacient P.V. splňoval klinická kritéria ALPS, ale bez prokázané mutace Fas. Metodou průtokové cytometrie bylo měřeno zastoupení lymfoidních subpopulací v periferní krvi. cDNA řetězce α molekuly CD8 byla amplifikována pomocí RT-PCR, přečištěna a sekvenována. Koncentrace solubilní formy CD8 (sCD8) v séru byla stanovena metodou ELISA. **Výsledky:** V periferní krvi jsme zjistili deficit CD8+ buněk (0,02%). Ukázalo se, že deficit se objevuje jen při použití standardní protilátky schválené pro diagnostiku (klon SK1). Suspektní mutaci CD8 jsme vyloučili sekvenací cDNA α řetězce CD8. Další vyšetření ukázalo, že zdánlivý deficit je způsoben sérovým faktorem. U pacienta byla zjištěna zvýšená hladina sCD8. Prokázali jsme však, že samotné zvýšení hladiny sCD8 nezpůsobí falešnou negativitu CD8 na lymfocytech. **Závěr:** Protilátka anti-CD8 SK1, jejíž použití je schváleno pro diagnostické účely, může být blokována neznámým solubilním faktorem. Zatím se nepodařilo prokázat, že tímto faktorem je některá z forem sCD8.
Práce byla podpořena VZ MŠ 111300001 a VZ FNM 00000064203.

EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A DIFÚZNÍ BARIÉRY EXTRACELULÁRNÍHO PROSTORU V ASTROCYTÁRNÍCH NÁDORECH MOZKU

Zámečník J.,[1] Vargová L.,[2] Homola A.,[2] Tichý M.,[3] Beneš V.,[4] Kodet R.,[1] Syková E.[2]

[1]Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2.LF, [2]Ústav neurověd a Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, UK 2.LF, [3]Dětské neurochirurgické oddělení FN v Motole, [4]Neurochirurgická klinika UK 1.LF, ÚVN a IPVZ, Praha

Školitelé: Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., Prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

josef.zamecnik@lfmotol.cuni.cz

Změny ve velikosti, geometrii a složení extracelulárního prostoru (ECP) významně ovlivňují biologické chování nádorů CNS. Cílem naší práce byla korelace strukturálních změn a změn ve složení extracelulární matrix (ECM) astrocytárních nádorů mozku se studiemi difúzních parametrů ECP. Iontoforetickou metodou v reálném čase, která využívá iontově selektivních mikroelektrod, jsme v souboru 21 astrocytárních nádorů studovali objemovou frakci ECP (α) a tortuozitu (λ), odrážející množství difúzních překážek v ECP. Tkáň jsme histologicky zpracovali a stanovili mitotickou aktivitu, buněčnost nádoru a hustotu výběžků nádorových buněk. Imunohistochemicky jsme určili proliferaci nádoru (Ki-67, topoizomeráza-IIα) a složení ECM (tenascin, laminin, vitronectin, fibronectin, kolagen I - VI). Pozorovali jsme významný nárůst objemové frakce ECP s rostoucí proliferační aktivitou a tedy i malignitou nádoru, vždy se současným zvýšením tortuozity. V nádorech s nízkým stupněm malignity byl nárůst tortuozity úměrný hustotě výběžku nádorových buněk. V nádorech s vysokým stupněm malignity koreloval dramatický vzestup tortuozity s patologickou produkcí glykoproteinů ECM, zejména tenascinu. Ke změnám tortuozity ECP v nádorové tkáni nepřispívala zvýšená buněčnost tkáně ani přítomnost hyperplastických cév. S rostoucím stupněm malignity astrocytomů tedy dochází k výraznému zvětšení velikosti jejich ECP a ke zmnožení difúzních bariér v ECP, které tvoří zejména patologická ECM nádorové tkáně. Tyto změny mohou významně ovlivnit jak migraci nádorových buněk, tak difúzi léčiv v nádorech.

Podpora projektu: GACR 309/00/1430, VZ J13/98:111300004, VZ AV0Z5039906 a VZ FNM 00000064203.