

6. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE



Konaná dne 23. května 2005
pod záštitou děkana 1. LF
prof. MUDr. Štěpána Svačiny, DrSc.

6. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

Konaná dne 23. května 2005



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



**OBSAH**

Obsah	2
Slovo úvodem	3
Pozvánka	4
Seznam účastníků	5
Hodnotitelské komise	7
ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ	9
SEKCE PREGRADUÁLNÍ	10
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – PŘEDNÁŠKY	17
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – POSTERY	29
VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO	43
SEKCE PREGRADUÁLNÍ	44
Délka polyglutaminové domény genu <i>A1B1</i> jako prediktor vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací genu <i>BRCA1</i> – Ondřej Havránek	45
Identifikace podtypů M5 muskarinových acetylcholinových receptorů v srdeční tkáni laboratorního potkana – Martin Klein	50
Nová mutace genu <i>ATP7A</i> u nemocného s Menkesovým syndromem – Lubomír Králík	53
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – přednášky	55
The expression and function of <i>Caenorhabditis elegans</i> nuclear hormone receptor 40 – Eva Brožová	57
Úloha p21/WAF1 při cAMP-dependentní diferenciaci F9 buněk embryonálního karcinomu na parietální endoderm – Blanka Drdová	58
Regulated overexpression of dipeptidyl peptidase – IV and its growth inhibitory effect in human glioma cells – Petr Bušek	62
SEKCE POSTGRADUÁLNÍ – postery	67
The characterization of platelet membrane bound cellular prion protein – Adéla Broučková	69
Caspase activation during vaccinia virus-caused lytic infection – Martina Spišáková	71
Vztah oxidu dusnatého k beta3-adrenergní lipolýze a kaskádě cyklického AMP – Nikolína Kutinová-Canová	73
CENA MEDICAL TRIBUNE	79



Zapojení nejlepších pregraduálních studentů do výzkumné práce je vyvrcholením činnosti každé fakulty. Jsem rád, že jsme v této oblasti úspěšní a že je znovu Studentská vědecká konference obsazena. Postgraduální student by měl naopak především získávat zkušenosti na běžných konferencích a sjezdech lékařských společností. Naši studenti byli na podzim minulého roku úspěšní v nově vzniklé celostátní studentské vědecké konferenci v Hradci Králové.

Jsem rád, že studenty nadšené pro vědu máme, neboť v nich je budoucnost fakulty. Mezi nimi jsou nepochybně budoucí asistenti, docenti a profesori fakulty i noví přednostové. Vědecká činnost studentů je na fakultě od pedagogického procesu neoddělitelná a je zárukou rozvoje fakulty v budoucnosti. Těším se, že příštím rokem znovu počet studentů se zájmem o vědu naroste a že se počet účastníků konference dále zvýší.

*Prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
děkan Univerzity Karlovy v Praze
1. lékařské fakulty*



Děkan 1. LF UK prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., při zahájení 6. ročníku studentské vědecké konference na 1. LF UK.

6. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

1. lékařské fakulty

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

23. KVĚTNA 2005

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

6. studentskou vědeckou konferenci zahájí děkan 1. lékařské fakulty prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc. dne 23. května 2005 v 8.00 hodin ve Velké zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2.

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

SEKCE PREGRADUÁLNÍCH PRACÍ bude probíhat 23. května 2005 od 8.15 hodin v posluchárně Stomatologické kliniky 1. LF, Kateřinská 32, Praha 2.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍCH PRACÍ bude probíhat 23. května 2005 od 8.15 hodin ve Velké zasedací místnosti děkanátu 1. LF, Na Bojišti 3, Praha 2.

Prezentace proběhne na základě hodnocení komise formou přednášky nebo posteru.

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

Účastníky konference žádáme, aby si přinesli svůj osobní notebook.

K pozvánce je přiložen časový harmonogram jednotlivých vystoupení.

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

Prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
děkan 1. lékařské fakulty

Veškeré informace o konání SVK:

Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky 1. LF

Tatiana Králová, tel.: 224 964 358

e-mail: tkral@lf1.cuni.cz

SEZNAM ÚČASTNÍKŮ



SEZNAM ÚČASTNÍKŮ

SEKCE PREGRADUÁLNÍ

- Beneš Jan, 3. r.
- Havránek Ondřej, 4. r.
- Hippmann Radek, 4. r.
- Hontiová Jana, 5. r.
- Hrdinka Matouš, 4. r. PŘF UK
- Ingrischová Michaela, 5. r.
- Klein Martin, 5. r.
- Kozmík Tomáš, 4. r.
- Králík Lubomír, 4. r. PŘF UK
- Mikoviny Rudolf, 5. r.
- Moravec Jakub, 3. r.
- Nováková Martina, 4. r.
- Prejzek Vratislav, 2. r.
- Říha Pavel, 5. r.
- Šimečková Dita, 6. r.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ přednášky

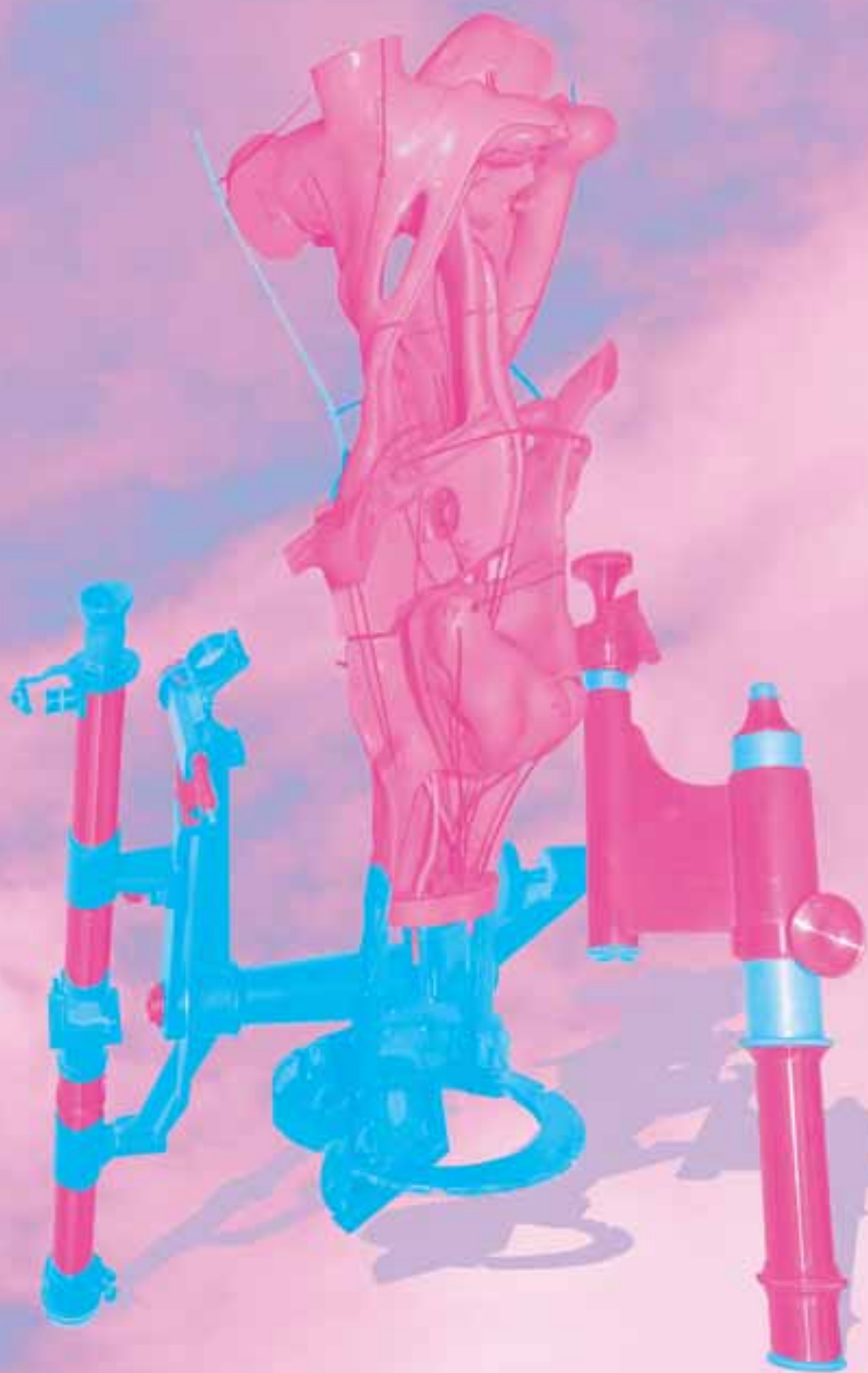
- Beránková Kateřina, Mgr., 2. r.
- Bouček Jan, MUDr., 2. r.
- Brantová Olga, Mgr., 1. r.
- Brožová Eva, Mgr., 7. r.
- Bušek Petr, MUDr., 1. r.
- Drdová Blanka, Mgr., 6. r.
- Dvořák Luboš, MUDr., 4. r.
- Flekač Milan, Mgr., 2. r.
- Kleiblová Petra, MUDr., 3. r.
- Krtil Jan, MUDr., 3. r.
- Křemen Jaromír, MUDr., 1. r.
- Kublová Martina, Mgr., 3. r.
- Leníček Martin, MUDr., 2. r.
- Libý Petr, MUDr., 2. r.
- Mikula Ivan, Ing., 3. r.
- Milotová Martina, Mgr., 2. r.
- Ort Michael, MUDr., 6. r.
- Stibůrek Lukáš, Mgr., 2. r.
- Szkutová Miroslava, Mgr., 1. r.
- Šimečková Kateřina, Mgr., 6. r.
- Vojtová Lucie, Ing.
- Zanvit Peter, Mgr., 4. r.
- Zouharová Eva, Ing., 1. r.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ postery

- Beran Ondřej, MUDr., 3. r.
- Broučková Adéla, Ing., 2. r.
- Buzková Helena, Mgr., 1. r.
- Bysterská Petra, Mgr., 1. r.
- Čížek Zdeněk, Ing., 2. r.
- Fábín Petr, Mgr., 1. r.
- Fraško Roman, MUDr.
- Glierová Hana, Mgr., 1. r.
- Himmerová Veronika, MUDr., 2. r.
- Jatchvliani Dato, MUDr.
- Klempíř Jiří, MUDr., 2. r.
- Kučera Robert, MUDr., 1. r.
- Kutinová-Canová Nikolína, MUDr., 5. r.

- Lačňák Zdeněk, MUDr.
- Lenčová Erika, MUDr., 3. r.
- Machovcová Alena, MUDr., 1. r.
- Panigaj Martin, Mgr., 2. r.
- Pavlíček Alexandr, Mgr., 1. r. PŘF
- Pechandová Kristýna, Mgr., 1. r.
- Podzimek Štěpán, Mgr., 3. r.
- Riljak Vladimír, MUDr., 1. r.
- Spišáková Martina, Mgr., 3. r.
- Szkutová Miroslava, Mgr., 1. r.
- Vaňková Zdeňka, MUDr., 1. r.
- Žižka Jan, Mgr., 2. r.

HODNOTITELSKÉ KOMISE



HODNOTITELSKÉ KOMISE

SEKCE PREGRADUÁLNÍ

Předseda: Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.
Členové: Prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.
Doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ přednášky

Předseda: Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
Členové: Prof. RNDr. František Vítek, DrSc.
Doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ postery

Předseda: Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.
Členové: Doc. MUDr. Ivan Matouš-Malbohan, CSc.
Odb. as. MUDr. Debora Karetová, CSc.
Prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ



ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ

SEKCE PREGRADUÁLNÍ

- Beneš Jan, 3. r., Nováková Martina, 4. r.
- Havránek Ondřej, 4. r.
- Hippmann Radek, 4. r.
- Hontiová Jana, 5. r.
- Hrdinka Matouš, 4. r. PŘF UK
- Ingrischová Michaela, 5. r.
- Klein Martin, 5. r.
- Kozmík Tomáš, 4. r.
- Králík Lubomír, 4. r. PŘF UK
- Mikoviny Rudolf, 5. r.
- Moravec Jakub, 3. r.
- Prejzek Vratislav, 2. r.
- Říha Pavel, 5. r.
- Šimečková Dita, 6. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

- Předseda:** Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.
Členové: Prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.
Doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.



VYŘAZENÍ GENU PRO C-FOS DRAMATICKY MĚNÍ MNOŽSTVÍ BETA-ADRENERGNIÍCH A MUSKARINOVÝCH RECEPTORŮ

Autoři: Jan Beneš a Martina Nováková

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

Úvod: Muskarinové a β -adrenergní receptory jsou dvojicí receptorů, které zprostředkovávají prakticky protichůdné účinky dané aktivací autonomního nervového systému. C-Fos je protein, který se v buněčné signalizaci uplatňuje jako třetí posel. Cílem této práce bylo zjistit vliv vyřazení genu pro c-Fos na density muskarinových a β -adrenergních receptorů v srdečních komorách a plicích.

Metodika: Stanovovali jsme množství podtypů muskarinových receptorů v srdeční tkáni potkanů metodou saturačních pokusů a simplifikovaných saturací [3 H]QNB (pro muskarinové receptory) a [3 H]CGP 12177 v homogenátech srdečních komor a plic. Výsledky: Zjistili jsme 2–3násobné zvýšení počtu jak muskarinových, tak β -adrenergních receptorů v srdečních komorách a plicích.

Závěr: Naše nálezy svědčí pro významnou roli c-Fos v determinaci množství receptorů na membránách buněk.

DÉLKA POLYGLUTAMINOVÉ DOMÉNY GENU *AIB1* JAKO PREDIKTOR VZNIKU KARCINOMU PRSU U NOSIČEK MUTACÍ GENU *BRCA1*

Autor: Ondřej Havránek

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

Nosičky mutací v genu *BRCA1* mají vysoké celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu a ovarií. Nástup onemocnění variuje mezi 30–75 lety. Kromě vlastního predispozičního genu ovlivňuje riziko vzniku nádoru řada epigenetických a genetických faktorů. Jedním z genů, modifikujících riziko vzniku karcinomu prsu u žen s mutací v genu *BRCA1* je koaktivátor estrogenního receptoru *AIB1* (amplified in breast cancer 1). Protein *AIB1* obsahuje polyglutaminovou (polyQ) doménu o variabilní délce, obvykle mezi 26–28Q. Proteiny s polyglutaminovou oblastí s <26Q a >28Q vykazují změněnou transaktivaci schopnost. Pacientky s mutací v genu *BRCA1* z populace Aškenazi židů s prodlouženou polyQ doménou *AIB1* inklinují ke vzniku karcinomu prsu v časnějším věku (RR=1,29), zatímco nosičství zkrácené polyQ domény je ochranným faktorem snižujícím riziko vzniku onemocnění (RR=0,55).

Cílem práce je zhodnotit polymorfismus CAG repeatu kódující polyQ doménu *AIB1* ve vztahu k riziku vzniku nádoru prsu v populaci pacientek s prokázanou mutací v genu *BRCA1*.

Analýza repeatu z genomové DNA byla provedena pomocí PCR a následně elektroforézy na polyakrylamidovém gelu s přídavkem Spreadexu (Elchrom Scientific, Basel) po vizualizaci SYBRGoldem (Molecular Probes).

Překvapivě, v populaci 122 pacientek s familiárním výskytem karcinomu prsu jsme detekovali pouze 3 alelické varianty (26Q, 28Q a 29Q) v homo i heterozygotních kombinacích. Ačkoliv četnost genotypů s alelou 29Q je vysoká (84 z 122; 69 %), její výskyt nekoreluje s dobou vzniku nádoru na základě doposud provedených statistických analýz. Pro úplné zhodnocení je prováděna analýza studovaného polymorfismu v neselektované populaci pacientek se sporadickým karcinomem prsu a v kontrolní populaci.

Nalezení vhodného prediktoru pro zpřesnění rizika vzniku karcinomu prsu je nezbytné zejména pro zlepšení prevence vzniku nádoru u zdravých nosiček mutací genu *BRCA1*.

Práce vzniká s podporou grantu Ligy proti rakovině

POČÍTAČOVÁ KONTROLA TVARU ZUBNÍHO OBLOKU A JEHO MOŽNÉ ZMĚNY U PACIENTŮ S ROZŠTĚPEM

Autor: Radek Hippmann

Školitel: Prof. MUDr. Tatjana Dostálová, DrSc., MBA, Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Rozštěpové vady obličeje jsou poměrně častým postižením, které se vyskytuje v prevalenci asi 1:400. Více jsou postiženi muži než ženy. Mezi rozštěpovými vadami, které postihují střední třetinu obličeje, se vyskytují nejčastěji rozštěpy rtu a patra. Vada postihuje ret, čelist a patro buď jednotlivě nebo v různé kombinaci. Terapie těchto vad je komplexní. Nejdříve dochází k úpravě chirurgické na kterou navazuje léčba ortodontická a protetická. Z ortodontického i protetického hlediska má důležitý podíl příznivý tvar zubního oblouku. Cílem této studie bylo posoudit tvar a rozměry horního a dolního oblouku u rozštěpových pacientů a porovnat výsledky s hodnotami u náhodně vybraného vzorku mladší dospělé populace a u pacientů s ortodontickou terapií bez rozštěpových vad.

Metodika: Vyšetřili jsme celkem 837 pacientů. Anamnestické údaje jsme zaznamenali do karty a zhotovili jsme studijní modely horního a dolního zubního oblouku. Tyto modely jsme nasníмали přístrojem Orthoscope a počítačovou analýzou jsme detekovali tvar a rozměr čelistí. Proměřili jsme vždy transversální rozměry mezi špičkami, prvními premoláry a prvními moláry. Poté jsme vyjádřili rozsah souboru, průměrnou hodnotu indexů a pomocí Studenova T-testu směrodatnou odchylku průměru jako míru rozptylu souboru. Všechny hodnoty a nasnímané obrázky jsme ukládali do databáze spolu se základními údaji o pacientech. Výsledky jsme poté porovnávali mezi jedinci se zdravou denticí, s ortodontickými vadami a rozštěpy.

Výsledky: Při srovnání rozměrových parametrů jsme dospěli k závěru, že není signifikantní rozdíl mezi rozměry zubních oblouků jedinců s rozštěpem po ortodontické terapii proti kontrolnímu souboru a pacientům pouze po ortodontické léčbě. Rozštěpová vada tedy výrazně nemění a nedeformuje tvar a velikost zubních oblouků těchto pacientů.

Závěr: Při ortodontické a protetické terapii rozštěpových vad, která navazuje na chirurgickou část sanace je velký problém rehabilitovat pacienta jak po stránce funkční tak estetické ve frontálním úseku chrupu. Po ortodontické léčbě před protetickým řešením není nezbytné řešit zúžený nebo jinak rozměrově změněný zubní oblouk. Vlastní protetická terapie se tedy může zaměřit pouze na klinické řešení včetně aplikace implantátů.

SYNDROM ŽLUTÝCH NEHTŮ – KASUISTIKA

Autor: Jana Hontiová

Školitel: MUDr. Magdalena Skořepová, CSc., Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN

Syndrom žlutých nehtů je onemocnění nejasné etiologie, které sestává z triády nehtových změn, lymfedému a respiračních manifestací (bronchiektázie, pleurální výpotek, recidivující pneumonie, bronchitis a sinusitis). Pacient, 66letý muž s léta trvající onychomykózou na nehtech nohou, trpěl od podzimu 2003 opakovanými exacerbacemi chronické bronchitidy, pro které byl v péči pneumologa. Od února 2004 zahájil dermatolog léčbu onychomykózy perorálním terbinafinem, avšak během léčby došlo naopak k novým nehtovým změnám i na nehtech rukou. Laboratorně se v nehtech střídala fungální a bakteriální flóra různých druhů. Na základě triády žlutých nehtů, lymfedému prstů rukou a opakovaných respiračních infekcí jsme stanovili diagnózu syndrom žlutých nehtů a místo antimykotik nasadili léčbu perorálním vitamínem E v dávce 400 mg/den. Zároveň byl pacient v péči pneumologa. V průběhu léčby ustoupily edémy prstů, poškozené nehty se začaly spontánně odlučovat a na jejich místě narůstaly nové nehtové ploténky normálního vzhledu. Syndrom je považován za vzácný, ale je pravděpodobné, že řada případů uniká diagnóze, protože je mylně považována za terapeuticky refrakterní onychomykózu. Uvádíme proto diferenciativní diagnostiku tohoto multidisciplinárního onemocnění.

AKUTNÍ INTERMITENTNÍ PORFYRIE: NOVÉ MUTACE V GENU PRO PORFOBILINOGEN DEAMINÁZU U PACIENTŮ Z ČESKÉ A SLOVENSKÉ REPUBLIKY

Autoři: Matouš Hrdinka, Dana Ulbrichová

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

Úvod: Akutní intermitentní porfyrie (AIP) je autozomálně dominantně děděné onemocnění, způsobené sníženou aktivitou porfobilinogen deaminázy (PBGD, EC: 4.3.1.8), třetího enzymu v biosyntetické dráze hemu. AIP se projevuje potenciálně letálními akutními záchvaty, které mohou být vyvolány mnoha vnějšími i vnitřními faktory. Klinické projevy jsou značně variabilní a více než 90 % heterozygotních jedinců zůstává celý život bez příznaků. Doposud bylo v genu pro PBGD identifikováno více než 250 mutací. Cílem práce bylo nalézt molekulární defekty u nově diagnostikovaných nemocných s akutní intermitentní porfyrií z České a Slovenské republiky.

Metodika: Byla izolována genomová DNA 36 osob ze sedmi nepříbuzných rodin s akutní intermitentní porfyrií. Mutační analýza byla provedena pomocí PCR a denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). Mutace byly ověřeny sekvencováním. K nalezení asymptomatických nositelů mutací byla navržena restriční štěpení.

Výsledky: Bylo identifikováno celkem osm mutací, z toho tři mutace nové (610 C>A, 675 delA, 966 insA) a pět mutací dříve popsanych (76 C>T, 77 G>A, 518 G>A, 771+1 G>T, 973 insG). Mutace 518 G>A je nová pro českou a slovenskou populaci. Zvláštní pozornost zasluhuje nález dvou mutací (518 G>A, 610 C>A) u jednoho nemocného. Obě mutace jsou v 10. exonu genu pro PBGD.

Závěr: Byly nalezeny tři nové mutace způsobující akutní intermitentní porfyrii u nemocných z České a Slovenské republiky. Naše nálezy potvrzují molekulární heterogenitu akutní intermitentní porfyrie a poskytují metodologii pro přesnou detekci asymptomatických nositelů patologické alely.

(Podpořeno granty GAUK 10/2004/C a Barrande)

JEDNOROZMĚRNÉ BAREVNÉ MAPOVÁNÍ SYSTOLICKÉHO TRANSATRIÁLNÍHO PRŮTOKU: NOVÁ METODA HODNOCENÍ COMPLIANCE LEVÉ SÍŇE

Autoři: Michaela Ingrischová, T. Paleček, J.C. Lubanda, A. Linhart, R. Trčková, M. Aschermann

Školitel: as. MUDr. Tomáš Paleček, II. interní klinika – klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Plnicí a vyprazdňovací funkce levé síně (LS) jsou důležitými determinantami kardiální výkonnosti. K hodnocení kontraktility funkce LS lze použít poměrně velké množství neinvazivních parametrů, posouzení plnicí funkce, resp. compliance LS, zůstává v klinické praxi problémem.

Cíl studie: Na skupině zdravých jedinců provést pilotní studii hodnocení transatriálního průtoku LS pomocí jednorozměrného barevného mapování s měřením rychlosti propagace systolického proudění (FVP LS) a s posouzením závislosti FVP LS na změnách předtížení v porovnání se změnami tradičních parametrů plnicí funkce LS: indexu expanze LS (IE), maximální rychlosti systolické vlny S v plicní žíle (S) a časově rychlostním integrálu vlny S (S-VTI).



Metodika: 16 zdravých dobrovolníků (27±4 let) bylo kompletně echokardiograficky vyšetřeno za klidových podmínek včetně hodnocení EI, S, S-VTI, FVP LS. Následně byla provedena měření sledovaných parametrů při zvýšení a poté snížení předtížení – výsledky budou prezentovány.

Závěr: Měření FVP LS u zdravých jedinců je technicky proveditelné. V porovnání s tradičně užívanými parametry plnicí funkce LS jeví hodnoty FVP LS menší závislost na změnách předtížení.

IDENTIFIKACE PODTYPŮ M_5 MUSKARINOVÝCH ACETYLCHOLINOVÝCH RECEPTORŮ V SRDEČNÍ TKÁNI LABORATORNÍHO POTKANA

Autor: Martin Klein

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

Úvod: Muskarinové receptorové podtypy se liší svojí tkáňovou distribucí. S určitým zjednodušením se dá říci, že v mozkové kůře převládá M_1 podtyp, v hladké svalovině a žlázách M_3 podtyp a v srdeční tkáni savců výhradně podtyp M_2 . Z některých prací však vyplývá, že se v srdečních tkáních, s druhovou variabilitou, mohou vyskytovat i jiné podtypy muskarinových receptorů. Cílem této práce je stanovit přítomnost a množství podtypů muskarinových acetylcholinových receptorů (MR) v srdeční tkáni potkanů.

Metodika: Stanovovali jsme množství podtypů muskarinových receptorů v srdeční tkáni potkanů metodou kompetičních pokusů se specifickým triciováním antagonistou: [3 H]NMS a specifickými kompetitory AQ-RA 741 a MT7 toxinu. Výsledky: Z dřívějších pozorování vyplynulo, že se v srdečních komorách vyskytují non- M_2 populace muskarinových receptorů, které předsavují 10–15 % celkového množství MR. Jako nejpravděpodobnější se zdála existence M_1 podtypu. V těchto pokusech potvrzujeme přítomnost M_1 podtypu a navíc se nám podařilo identifikovat i přítomnost M_5 podtypu (v zastoupení 4,03±1,22 %).

Závěr: Naše výsledky jako první ukazují na přítomnost podtypu M_5 , o němž se doposud uvažovalo jako o muskarinovém receptoru, vyskytujícím se pouze v centrálním nervovém systému.

APOPTOZA LEUKEMICKÝCH BUNĚK PO PODÁNÍ MOLEKUL AKTIVUJÍCÍCH RECEPTOROVOU A MITOCHONDRIÁLNÍ SIGNÁLNÍ APOPTOTICKOU DRÁHU

Autor: Tomáš Kozmík

Školitelé: Pavel Klener, Eva Ivanová, Emanuel Nečas, MUDr. Jan Živný, Ph.D.,
Ústav patologické fyziologie 1. LF UK

Úvod: Nové léčebné postupy by mohly výrazně přispět k zefektivnění terapie leukémií, kombinací klasické cytostatické léčby, apoptozu indukujících cytokinů a nově vyvíjených chelátorů železa. Analyzovali jsme, zda rezistence vůči TRAILem (Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand) indukované apoptoze je asociovaná s rezistencí na jiné, apoptozu indukující látky.

Metody: Expres TRAIL receptorů byla měřena pomocí průtokové cytometrie a metodou real-time PCR, apoptoza průtokovou cytometrií za použití Annexin-V-PE kitu a množství jednotlivých proteinů z rodiny NF-kappaB transkripčních faktorů v jaderných lyzátech, metodou na bázi ELISA.

Výsledky: Myeloidní leukemická linie HL-60 obsahuje asi 1 buňku z 1800 rezistentní na TRAIL. Z rezistentních buněk jsme připravili TRAIL-rezistentní klon. Potvrdili jsme, že TRAILová rezistence TRAIL-rezistentních linií je stabilní v čase a stabilní je i fenotyp z hlediska exprese TRAIL receptorů. Zjistili jsme, že senzitivita TRAIL-rezistentních HL-60 buněk na cytostatika (AraC a Idarubicin), na chelátory železa (PIH, Dp44mT), se významně neliší mezi TRAIL-rezistentními a TRAIL-senzitivními HL-60 buněčnými liniemi. K identifikaci potenciálního mechanismu TRAIL rezistence jsme měřili translokaci proteinů z rodiny NF-kappaB, RELA a p50, do jádra.

Závěr: Buňky myeloidní leukemické linie HL-60 mohou uniknout TRAILem-indukované apoptoze. Kombinací TRAILu a cytostatik případně chelátorů železa je možné indukovat apoptozu u TRAIL rezistentních klonů. U všech testovaných HL-60 buněčných klonů TRAIL indukuje translokaci RELA a p50 do jádra.

GAUK 50/2004/c

NOVÁ MUTACE V GENU ATP7A U NEMOCNÉHO S MENKESOVÝM SYNDROMEM

Autor: Lubomír Králík

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

Úvod: Menkesova choroba je vzácně se vyskytující recesivní genetické onemocnění vázané na chromosom X s těžkou poruchou metabolismu mědi. Postižení muži trpí celkovým nedostatkem mědi v důsledku poruchy vstřebávání mědi ve střevě a chybné distribuce mědi v těle projevující se snížením pevnosti pojivových tkání a vážnými neurodegenerativními změnami v raném dětství. Choroba je způsobena mutací Menkesova genu (ATP7A), který zaujímá asi 140 kb genomové DNA a obsahuje 23 exonů, které kódují 1500 aminokyselin dlouhou transmembránovou ATPasu typu P účastníci se přenosu mědi v buňce. V této studii byla provedena mutační analýza pacientů s Menkesovou chorobou z České republiky.

Metodika: Genomová DNA dvou nepříbuzných nemocných s Menkesovým syndromem byla vyšetřena pro přítomnost mutací v genu ATP7A využitím přímého sekvencování všech 23 exonů, které byly namnoženy pomocí PCR. Zjištěné mutace byly následně rovněž ověřeny restriční analýzou.

Výsledky: V genu ATP7A byly u vyšetřovaných nemocných nalezeny následující mutace: E1249X a Q1288X. Mutace E1249X dosud nebyla publikována.

Závěr: V genu ATP7A jsme našli novou mutaci – E1249X. Tato mutace vede k předčasnému ukončení Menkesova proteinu. Nález vede k hlubšímu pochopení molekulární podstaty Menkesova syndromu a je důležitý rovněž pro prenatální diagnostiku tohoto letálního onemocnění v postižených rodinách.

(Podpořeno granty GAUK 7/2004/C a MSM 0021620806)

VLIV POLYMORFIZMU CYP2D6 NA FARMAKOKINETIKU A MIOTICKÝ ÚČINEK TRAMADOLU U ZDRAVÝCH DOBROVOLNÍKŮ

Autor: Rudolf Mikoviny

Školitelé: Ondřej Slanař, Milan Nobilis¹, Jaroslav Květina¹, Jeffrey R. Idle, František Perlík, Farmakologický ústav 1. LF UK, Praha (¹ Ústav experimentální biofarmacie, společné pracoviště ČAV a PRO. MED. CS. Praha, a. s., Hradec Králové)

Úvod: Tramadol je analgetikum, které je metabolizováno na aktivní metabolit O-desmethyltramadol (M1) polymorfní cestou CYP2D6.

Cíl: Cílem této studie je objektivizovat rozdíly ve farmakokinetice a farmakodynamice tramadolu u osob s rozdílným genotypem CYP2D6.

Metodika: Farmakokinetické parametry tramadolu a M1 jsme stanovili z plazmatických koncentrací z odběrů před podáním 100 mg tramadolu a 2,5; 4; 8 a 12 hodin poté v sedmičlenných skupinách rychlých (EM), intermediárních (IM) a pomalých (PM) metabolizátorů. K posouzení míry (objektivizace opioidního účinku) jsme ve stejných časových intervalech použili metodu infračervené pupilometrie.

Výsledky: Průměrné hodnoty (\pm SD) C_{max} , $AUC_{(0-24)}$ a $t_{1/2}$ byly v genotypové skupině EM 413 ± 101 nmol/l; 4986 ± 1763 nmol.h.l⁻¹ a $6,3 \pm 0,9$ h; ve skupině IM 547 ± 116 nmol/l, 7408 ± 1266 nmol.h.l⁻¹ a $9,3 \pm 2,9$ h, a ve skupině PM 699 ± 155 nmol/l, 11544 ± 3121 nmol.h.l⁻¹ a $25,9 \pm 11,9$ h. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami jsou statisticky významné. V případě farmakokinetických parametrů M1 jsme pozorovali signifikantně nižší hodnoty C_{max} , $AUC_{(0-24)}$ a delší $t_{1/2}$ u PM ve srovnání s ostatními skupinami. Průměrné hodnoty E_{max} (maximální zjištěná míra) u EM, IM, a PM byly $1,83 \pm 0,95$; $1,25 \pm 0,73$ a $0,58 \pm 0,24$ mm. Hodnoty E_{max} a AUC účinku byly signifikantně nižší u skupiny PM ve srovnání s EM.

Závěr: Farmakokinetika tramadolu i jeho opioidní působení je závislé na geneticky determinované aktivitě CYP2D6.

Práce byla podpořena Rozvojovým projektem UK č. 406/405 2005

AKTIVITA NADPH OXIDÁZY GRANULOCYTŮ PERIFERNÍ KRVE U NORMO- A HYPERTONIKŮ

Autor: Jakub Moravec

Školitel: MUDr. Martin Vejražka, Ústav lékařské biochemie 1. LF UK

Zvýšená aktivita NADPH oxidázy cévní stěny má svou úlohu v patogenezi hypertenze. Tento enzym se v mnohém podobá NADPH oxidáze granulocytů, která má mnohonásobně vyšší aktivitu a podílí se na imunitní reakci. Regulace obou enzymů se nespíše liší; přesto byla popsána vyšší aktivita fagocytární NADPH oxidázy u laboratorních potkanů s vrozenou arteriální hypertenzí (SHR). Příčina tohoto zvýšení může být primární (např. změna podjednotky shodné pro oba enzymy, porucha společné části regulační kaskády) i sekundární (indukce NADPH oxidázy již popsaným zpětnovazebným mechanismem při nadprodukci ROS). Cílem předkládané pilotní studie bylo zjistit, zda je NADPH oxidáza granulocytů aktivnější také u lidí s arteriální hypertenzí. Pokud by tomu tak bylo, mohlo by stanovení aktivity NADPH oxidázy granulocytů sloužit jako nová diagnostická metoda pro klasifikaci časných fází hypertenze a případně i predispozice k tomuto onemocnění. Zavedli jsme techniku pro stanovení aktivity NADPH oxidázy v granulocytech izolovaných z periferní krve pomocí tetrazoliového derivátu WST-1(CAS 150849-52-8). Zabývali jsme se preanalytickou fází, stabilitou vzorků a různými způsoby kvantifikace buněk. Aktivita NADPH oxidázy granulocytů osob léčených pro arteriální hypertenzi byla o 60 procent vyšší než u normotoniců. Pokud se výsledky této pilotní studie potvrdí i v rozsáhlejší souboru, budeme se zabývat změnami v aktivitě granulocytární NADPH oxidázy u různých typů arteriální hypertenze.

VLIV DEFINOVANÉHO ÚSEKU CHROMOZOMU 2 SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍHO POTKANA NA GLUKÓZOVOU TOLERANCI A DISTRIBUCI TĚLESNÉHO TUKU

Autor: Vratislav Prejzek

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

Úvod: Multifaktoriální poruchy metabolismu sacharidů a lipidů jsou závažným zdravotnickým problémem zejména ve vyspělých zemích. Zkoumání takových komplexních znaků v běžné lidské populaci je obtížné, proto se s výhodou využí-



vají geneticky definované modely. V naší studii jsme sledovali význam definovaného úseku genomu na metabolický profil nově ustaveného modelového kmene.

Metody: Dvojitě kongenní kmen BN-Lx. SHR2 byl vytvořen vnesením úseku chromozomu 2 SHR na genetické pozadí kongenního kmene BN-Lx. Rozsah diferenciálního segmentu byl definován pomocí sady polymorfních mikrosatelitních markerů. Dospělí samci kmenů BN-Lx (n=6) a BN-Lx. SHR2 (n=6) byli krmeni vysokosacharózovou dietou (VSD) po dobu 1 týdne. Před a po podání diety byl proveden orální glukózový toleranční test (OGTT), na konci experimentu byla zjištěna hmotnost srdce, jater, ledvin, nadledvin, varlat, epididimálního a retroperitoneálního tukového tělesa. Data byla analyzována metodou dvojcestné analýzy rozptylu s faktory Kmen a Dieta.

Výsledky: Vymezili jsme diferenciální segment SHR původu u kmene BN-Lx. SHR2 v oblasti mezi *D2Mit5* a *D2Rat107*, což představuje úsek o velikosti cca 150Mb. BN-Lx. SHR2 vykázal výrazně odlišný průběh OGTT, např. reziduální plocha pod glykemickou křivkou byla signifikantně vyšší u BN-Lx. SHR2 před i po VSD ($484,8 \pm 38,5$ vs $235,5 \pm 33,0$ mmol/l/3 h, $p < 0,001$ pro faktor Kmen). Dále jsme pozorovali signifikantní rozdíly ve dvou morfologických parametrech: relativní hmotnosti ledvin a retroperitoneálního tukového tělesa.

Závěr: Definovali jsme genetický vliv specifického úseku genomu na metabolismus tuků a sacharidů. Vnesením tohoto úseku z kmene SHR na genetické pozadí kmene BN-Lx došlo k zhoršení glukózové tolerance a specifické redistribuci tělesného tuku. Tyto efekty jsou zřejmě způsobeny geny přítomnými v rámci námi definovaného úseku druhého chromozomu potkana. Nově ustavený dvojitě kongenní kmen BN-Lx. SHR2 je proto vhodným, geneticky přesně definovaným modelem pro výzkum poruch metabolismu sacharidů a lipidů.

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR THE TRANSFER OF BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEINS INTO HUMAN THROMBOCYTES

Author: Pavel Říha

Advisor: Priv.-Doz. Dr. med. Albert Smolenski, Institut für Biochemie II, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany

One of the best ways to perform the analysis of the function of a target protein in the living cellular environment is its introduction into cells. The standard method is the transfection with a plasmid encoding the target protein. Since this method requires cells equipped with a fully functional gene expression system, it cannot be performed in thrombocytes. The object of this study was to develop a new method for introduction of intact fully functional protein into living thrombocytes.

In the first experiment we tested a viral protein transduction domain method. The green fluorescent protein (GFP) was tagged with the translocation motif (TLM) of PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigen (TLM-EGFP). Platelets were incubated with various concentrations of TLM-EGFP at different temperatures and incubation times. Neither flow cytometry nor Western Blot of platelet lysates (anti-GFP antibody) were able to detect successful introduction of TLM-EGFP.

The second experiment was the application of the protein transfection reagent „ProteoJuice“ (Novagen) to introduce GFP. Since this method has been intended for transfection of eukaryotic cells, it was needed to optimise ProteoJuice concentration, GFP concentration, ambient temperature and incubation time. Flow cytometry detected strong GFP fluorescence from platelets incubated with GFP and ProteoJuice. A confocal microscope (630× magnification) was used to ascertain the localisation of GFP inside the platelets. Using GFP fluorescence and phycoerythrin tagged antibodies against membrane localized P-selectin, we cannot definitely ascertain, whether the light emitted by GFP originated from extracellular ProteoJuice-GFP complexes tightly attached to the membrane of thrombocytes or from intracellularly introduced GFP.

This study was supported by grant Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 553 and scholarship Program na podporu rozvoje internacionalizace

INSULIN PROTECTS MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS FROM CYTOTOXIC EFFECTS OF OXIDIZED LDL IN VITRO

Author: Pavel Říha

Advisor: Anne Nègre-Salvayre, Dr Pharm, Ph.D., INSERM U-466, Faculté des Sciences Médicales, Université Paul Sabatier, CHU Rangueil, Toulouse, France

Hyperlipidemia, hyperglycemia and oxidative stress cause the loss of integrity of the vascular endothelium and its dysfunction. The oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) interfere with regulatory pathways of inflammation, apoptosis or proliferation, and thus they are considered to play the major role in atherogenesis. To contribute to better understanding of these processes, we investigated effects of oxLDL on human microvascular endothelial cells (HMEC-1) under the insulin treatment.

After the incubation in medium containing (a) high concentration of glucose, (b, c) glycation reagents glyoxal (GO) or methylglyoxal (MGO), or (d) in control conditions, HMEC-1 were exposed for 24 hours to copper ion-oxidized LDL (10 mg/dl) together with insulin (1 µg/ml) or placebo (PBS). The number of surviving HMEC-1 was determined by the MTT-test. Lipid peroxidation was assessed by measurement of thiobarbituric acid reactive substances in medium.

The MTT-test revealed that oxLDL-induced apoptosis of HMEC-1 was significantly ($P < 0.0001$, one-way ANOVA) reduced by insulin (cell survival (mean \pm SEM): 102.8 \pm 7.5 %, 29.3 \pm 1.4 %, 44.8 \pm 3.0 % in control, placebo or insulin treated group, respectively). The survival of insulin-treated cells incubated with oxLDL and (a) glucose, (b) GO or (c) MGO were always significantly ($P < 0.0001$, two-way ANOVA, treatment \times concentration) higher than cell survival of appropriate placebo-treated groups.

High ambient concentrations of glucose, glycation reagents and oxLDL induce apoptosis of cultured endothelial cells that could be largely prevented by insulin in vitro. These findings suggest a novel role of insulin in direct sustaining the endothelial integrity.

This study was supported by the Prix de Medecine République Française et Groupe Fournier

EXPERIMENTÁLNÍ UŽITÍ HYDROGELU V PLASTICKÉ A REKONSTRUKČNÍ CHIRURGII

Autor: Dita Šimečková

Školitel: MUDr. Karel Urban, Klinika plastické chirurgie 1. LF UK a FN Na Bulovce

V této práci bychom se chtěli zaměřit na použití hydrogelů se zvýšeným obsahem karboxylových skupin pro podkožní implantace v rekonstrukční a estetické chirurgii. Tyto hydrogely mají vynikající biotoleranci a biostabilitu. Jejich hlavní výhodou je minimální reakce na cizí těleso po implantaci a vynikající inertnost, takže neadherují ke tkáním ani k vazivovému pouzdru, které se kolem nich může, ale také nemusí vytvořit, což zajišťuje reverzibilitu implantace, která je obzvláště důležitá u elektivních chirurgických zákroků. V experimentu plánujeme použití dvou typů hydrogelů: WIOL-C a AQUACRYL 90.

Modelem pro implantaci hydrogelu se stal potkan. Jedné skupině potkanů byl hydrogel implantován ve formě fólie a druhé skupině ve formě vlákna. První vyhodnocení výsledků proběhlo po 6 měsících po implantaci, konečné po 1 roce s explantací a histologickým vyšetřením vzorku, včetně celkového vyhodnocení.

Explantace po 6 měsících a 12 měsících: Implantát bez kolonizace zánětlivými elementy, pouzdro tenké vazivové bez zánětu, mnohobuněčné buňky nepřítomny. Průměrná tloušťka vazivového pouzdra je 20–40 μ m.

Po histologickém vyšetření vzorků jsme si potvrdili předpoklad vytvoření velmi jemného vazivového pouzdra. S odstupem 6 měsíců nedošlo k jeho ztlouštění, ztuhnutí nebo kontrakci. Lze také předpokládat, že tyto vysoce kompatibilní povrchy, ke kterým neadherují ani proteiny ani buňky, nebudou kolonizovány bakteriemi a sníží tak riziko infekce implantátu.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY



ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ přednášky

- Beránková Kateřina, Mgr., 2. r.
- Bouček Jan, MUDr., 2. r.
- Brantová Olga, Mgr., 1. r.
- Brožová Eva, Mgr., 7. r.
- Bušek Petr, MUDr., 1. r.
- Drdová Blanka, Mgr., 6. r.
- Dvořák Luboš, MUDr., 4. r.
- Flekač Milan, Mgr., 2. r.
- Kleiblová Petra, MUDr., 3. r.
- Krtil Jan, MUDr., 3. r.
- Křemen Jaromír, MUDr., 1. r.
- Kublová Martina, Mgr., 3. r.
- Leníček Martin, MUDr., 2. r.
- Libý Petr, MUDr., 2. r.
- Mikula Ivan, Ing., 3. r.
- Milotová Martina, Mgr., 2. r.
- Ort Michael, MUDr., 6. r.
- Stibůrek Lukáš, Mgr., 2. r.
- Szkutová Miroslava, Mgr., 1. r.
- Šimečková Kateřina, Mgr., 6. r.
- Vojtová Lucie, Ing.
- Zanvit Peter, Mgr., 4. r.
- Zouharová Eva, Ing., 1. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

- Předseda:** Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
Členové: Prof. RNDr. František Vítek, DrSc.
Doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.



GAMMA-HYDROXYBUTYRIC ACID STABILITY AND NEOFORMATION IN BIOLOGICAL FLUIDS

Authors: Mgr. Kateřina Beránková, K. Mutňanská, M. Balíková

Advisor: Doc. Ing. Marie Balíková CSc., Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a naturally occurring substance in biological fluids in nanomolar concentration and it is formed in GABA metabolism.

In many countries it is an illicit drug known as „Liquid Ecstasy“ popular among youths at dance parties. Recently it has also become misused in criminal offences in order to influence a victim.

In the interpretation of toxicological findings it is important to differentiate between endogenous and exogenous levels of GHB. The GHB level in biological samples (both antemortem and postmortem) can increase during storage as a result of microbial effects. There is also a significant difference between living and deceased humans' GHB concentration in biological fluids.

The aim of our study was to analyse samples (blood, urine) obtained from living and deceased subjects and stored under various conditions of temperature (-20 °C, +4 °C) and preservation (with or without NaF) in order to investigate the GHB level and its possible neoformation.

Samples were analysed over the eight-month period, prepared by liquid-liquid reextraction with silylation and identified by gas chromatography-mass spectrometry method (GC-MS).

Our findings indicate a strong effect of storage conditions on GHB neoformation in fluids and suggest a high increase of GHB in postmortem samples (both blood and urine), whereas only a slight increase in antemortem urine and no GHB detected in antemortem blood have been observed.

SMĚROVANÉ POLYMERNÍ KONJUGÁTY V TERAPII SPINOCELULÁRNÍCH KARCINOMŮ HLAVY A KRKU

Autoři: MUDr. Jan Bouček, Jan Betka, Karel Ulbrich, Blanka Říhová

Školitelé: Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc., MBÚ AV ČR, Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc.,
Klinika ORL 1. LF UK a FN Motol

Nádory hlavy a krku tvoří šestou nejčastější malignitu v evropských zemích. Z toho spinocelulární karcinomy (HNSCC) tvoří více než 90 %. Navzdory pokrokům v chirurgických, a také v ostatních léčebných přístupech, nepřekračuje pravděpodobnost přežití pacienta s HNSCC v horizontu 5 let 50 %.

Směřované polymerní konjugáty na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA) představují novou perspektivu pro chemoterapeutickou léčbu nádorů.

Preklinické studie dokazují, že tato léčiva mají nejen cytostatický, ale i imunomodulační účinek a přitom vykazují pouze minimální nežádoucí účinky.

Cytostatické účinky konjugátů směřovaných protilátkou rozpoznávající EGFR jsme testovali na linii FaDu, experimentálním modelu HNSCC. Expresce receptorů a specifita vazby byla stanovena pomocí průtokové cytometrie (Becton Dickinson FACSORTER).

Prokázali jsme, že cytostatické účinky *in vitro* vyjádřené jako IC₅₀ (koncentrace doxorubicinu inhibující proliferaci léčebných buněk na 50 % ve srovnání s kontrolou) jsou u protilátkou směřovaných konjugátů přibližně 20× vyšší ve srovnání s konjugátem nesměrovaným (bez protilátky) a 10× vyšší ve srovnání s volnou protilátkou.

Naše *in vitro*, společně s právě probíhajícími *in vivo* experimenty naznačují, že by směrované konjugáty mohly být perspektivní léčebnou modalitou v léčbě HNSCC.

ULTRASTRUKTURÁLNÍ ZMĚNY MITOCHONDIÍ V KULTIVOVANÝCH KOŽNÍCH FIBROBLASTECH PACIENTŮ S MITOCHONDIÁLNÍMI PORUCHAMI

Autoři: Mgr. Olga Brantová, Jana Sládková, Markéta Tesařová, Hana Hansíková, Jiří Zeman

Školitelé: RNDr. Hana Hansíková, CSc., RNDr. Jana Sládková, CSc., Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN

Úvod: Mitochondriální onemocnění představují rozsáhlou skupinu dědičně podmíněných i získaných onemocnění jejichž incidence je odhadována na 1:5–10 000. Pro jejich fenotypovou variabilitu je diagnostika mitochondriálních chorob velmi náročná a mikroskopické metody včetně elektronové mikroskopie zde mají nezastupitelnou roli. V naší studii jsme se zaměřili na ultrastrukturální změny mitochondrií v liniích kultivovaných fibroblastů nesoucích tři různé patologické mutace v mitochondriální DNA (mtDNA), 3243A→G (53 % heteroplazmie), 8344A→G (48 % heteroplazmie) a 8993 T→G (91 % heteroplazmie), které vedou k rozvoji závažných klinických onemocnění.

Metodika: Pro sledování změn ultrastruktury mitochondrií v kultivovaných fibroblastech byla zavedena Luftova metoda fixace buněk pro elektronovou mikroskopii. Aktivity komplexů dýchacího řetězce byly sledovány spektrofotometricky, proteinový profil pomocí dvourozměrné elektroforézy, hladina heteroplazmie mtDNA pomocí RFLP.

Výsledky: Ve všech liniích fibroblastů byly patrné změny v ultrastruktuře mitochondrií. V buňkách byla přítomna heterogenní směs abnormálních, částečně zvětšených mitochondrií s krystami nezvyklého tvaru nebo chybějícími. Úroveň změn

mitochondriální ultrastruktury byla rozdílná mezi jednotlivými buňkami dané buněčné linie. Tyto rozdíly by mohly být způsobeny změnami v hladinách heteroplazmie mtDNA mutace mezi jednotlivými buňkami, které jsme již dříve prokázali.

Závěr: Analýza fibroblastů nesoucích různé mtDNA mutace prokázala výskyt stejných strukturních abnormalit mitochondrií bez závislosti na typu mutace.

Podporováno MSM 0021620806

THE EXPRESSION AND FUNCTION OF *CAENORHABDITIS ELEGANS* NUCLEAR HORMONE RECEPTOR 40

Authors: Mgr. Eva Brožová, Kateřina Šimečková, Zdeněk Kostrouch a Marta Kostrouchová
Advisor: MUDr. Marta Kostrouchova, CSc., Laboratory of Molecular Biology and Genetics, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

C. elegans nuclear hormone receptors (NHRs) that are distantly homologous to vertebrate retinoid receptors may be divided according to their region directly involved in the contact with DNA, the P box. We are studying NHRs that are characterized by the P box sequence CNGCKT. NHR-40 belongs to the subgroup that has 9 amino acid residues in the inner part of the second zinc finger, similar to mammalian retinoid receptors.

The expression of *nhr-40*, detected by RT PCR, starts in embryos and continues during larval stages. There are at least 3 isoforms of NHR-40 due to differential splicing and the use of at least two promoters that we have begun to characterize. Transgenic lines carrying a GFP reporter gene controlled by either promoter showed expression in muscles and neuronal cells. A truncated region of the first promoter leads to expression in neurons while the second promoter additionally drives expression of *nhr-40::GFP* in ventral and dorsal nerve cords, utse and *uv1*, 2 and 3 cells. The function of NHR-40 was studied by RNA interference, by induction of expression of mutated constructs in transgenic animals and using a *nhr-40* deletion strain kindly provided by The *C. elegans* Gene Knockout Consortium. The *nhr-40* loss-of-function phenotype revealed a role during late embryogenesis and in the L1 stage.

REGULATED OVEREXPRESSION OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE-IV AND ITS GROWTH INHIBITORY EFFECT IN HUMAN GLIOMA CELLS

Autor: MUDr. Petr Bušek
Školitel: Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc., Laboratoř biologie nádorové buňky, Ústav lékařské biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK

Numerous biologically active peptides contain an evolutionary conserved proline residue as a proteolytic-processing regulatory element. Limited proteolysis of such peptides by proline specific dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) and DPP-IV related „Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs“ (DASH) leads to both quantitative and qualitative changes of their signaling potential. Several DASH have been shown to participate in the regulation of multiple important cellular programs, including cell growth, transformation, invasion and tumor metastasis.

T98G glioma cells were transfected with DPP-IV using a Mifepriston inducible expression system. The transfected cells robustly upregulate DPP-IV mRNA and exhibit a hundred fold increase in DPP-IV enzymatic activity upon Mifepriston induction. The growth of induced cells is substantially suppressed. Further, DPP-IV upregulation is accompanied by a decreased invasive potential as assessed by the Matrigel invasion assay. In addition, we detected parallel decrease in expression of another enzymatically active DASH – fibroblast activation protein – and upregulation of NK1, a receptor of substance P, which is a DPP-IV substrate and glioma cell proliferation stimulator.

Together, observed antioncogenic effect of DPP-IV in glioma cells may be mediated by hydrolytic modification of auto- or paracrine growth factor(s), DASH substrate(s). Further, existence of an integral and cooperating „DASH system“, involving DASH, their substrates and corresponding receptors is suggested by the observation of concomitant changes of expression of other DASH and a compensatory modulation of NK1 expression.

ÚLOHA P21/WAF1 PŘI CAMP-DEPENDENTNÍ DIFERENCIACI F9 BUNĚK EMBRYONÁLNÍHO KARCINOMU NA PARIETÁLNÍ ENDODERM

Autoři: Mgr. Blanka Drdová, MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc.
Školitel: MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc., Oddělení molekulární biologie pneumologie KPHCH, FN Bulovka

Protein p21/WAF1 (p21) je multifunkční protein, který má zásadní význam zejména při zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Hraje úlohu také při inhibici apoptózy a má často zvýšenou hladinu při senescenci a diferenciaci některých typů buněk. Při diferenciaci F9 buněk myšičího embryonálního karcinomu na parietální endoderm jsme zjistili, že z proteinů, které se účastní buněčného cyklu, vykazuje nejvýraznější změnu právě cyklin dependentní kinázový inhibitor p21. K jeho akumulaci v diferencovaných buňkách přispívá zvýšení hladiny jeho mRNA i stabilizace proteinu. Zatímco v nediferencovaných buňkách byl p21 lokalizován jen v jádře, u diferencovaných buněk dochází k částečné relokaci do cytoplazmy. S tímto kompartmentem je asociovaná jeho známá antiapoptotická funkce. K určení významu vysoké hladiny proteinu při diferenciaci byly získány klony F9 buněk ektopicky exprimující p21 v nediferencovaném stavu. U nich však nebyly detekovány markery typické pro diferencované buňky, takže sám protein diferenciaci nenavozuje. Profil buněčného



cyklu z průtokové cytometrie těchto klonů se od kontrolních F9 buněk liší jen lehce zvýšeným počtem buněk v G2 fázi. Byl také získán klon s ektopicky exprimovaným antisense p21, který v diferencovaném stavu snížil hladinu endogenního proteinu. Tento klon vykazuje větší subG1fázi indikující větší frakci apoptotických buněk na konci diferenciace. V reporterových studiích byl sledován vliv p21 na expresi trombomodulinu, specifického markeru parietální diferenciace F9 buněk. Transfekce exogeního p21 aktivovala trombomodulinový promotor-reportér v nediferencovaných i diferencovaných F9 buňkách. Transfekce p21-antisense konstruktů naopak inhibovala aktivitu tohoto promotoru-reportéru. Transfekce p21 také zvyšovala aktivitu GAL-p300(1-1303), který byl testován s trombomodulinovým promotorem s vazebnými GAL místy. To naznačuje, že p21 může působit na transkripci přes derepresi p300 N-terminální represorové domény a zvyšovat tak funkci p300 koaktivátoru. Souhrně výsledky naznačují pozitivní úlohu p21 při transkripci markerů diferenciace a možnou apoptotickou úlohu během diferenciace F9 buněk embryonálního karcinomu na parietální endoderm.

PŘÍNOS LEUKOCYTÁRNÍ FILTRACE PŘI TRANSPLANTACI SRDCE

Autoři: MUDr. Luboš Dvořák, Pirk J., Kovář J., Honsová E., Janek B.

Školitel: Prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc., Klinika kardiovaskulární chirurgie, IKEM Praha

Úvod: Leukocyty, zvláště aktivované neutrofilie zodpovídají za poškození endotelu dárcovského myokardu při reperfuzi u transplantace srdce (TxS), čímž se podílí na časně i pozdní mortalitě po TxS. Zapojení leukocytárních filtrů do okruhu mimotělního oběhu a okruhu sekundární krevní kardioplegie (SKK) je příležitostí ke snížení reperfuzního poškození postischemického srdečního štěpu.

Metodika: Bezpečnost a efektivnost leukocytární filtrace jsme ověřovali u 40 pacientů indikovaných k TxS, kteří byli v rámci prospektivní klinické randomizované studie rozděleni do skupiny A (n=20) s použitím leukocytárních filtrů a kontrolní skupiny B (n=20) s použitím pouze techniky prosté SKK. Sledovali jsme markery myokardiálního poškození, markery metabolisme kys. arachidonové (TxB2), krevní obraz, biopsie myokardu, hemodynamické hodnoty, imunologické markery a řadu dalších klinických ukazatelů. Během ročního pooperačního sledování jsme hodnotili endomyokardiální biopsie, echokardiografie i ultrazvukové a koronarografické vyšetření věnčitých tepen.

Výsledky: Dosud dosažené výsledky naznačují příznivý vliv leukocytární filtrace při reperfuzi srdečního štěpu na prevenci ischemicko-reperfuzního poškození myokardu, zejména v oblasti ultrastrukturálních změn myokardu, markerů reperfuzního poškození, pooperačního fungování štěpu a klinického průběhu, i výskytu rejekčních epizod.

Závěr: Použití leukocytárních filtrů při TxS je efektivní, bezpečnou a jednoduchou metodou ochrany myokardu, která předchází významnému reperfuznímu poškození a zlepšuje tak potransplantační fungování srdečního štěpu.

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

POLYMORFISMY PARAOXONASY 1 U PACIENTŮ S DIABETEM MELLITEM 2. TYPU

Autor: MUDr. Milan Flekač

Školitel: Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc., III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Úvod: U pacientů s diabetem byl opakovaně prokázán vystupňovaný oxidační stres a jednou z možných příčin se zdá být i snížená antioxidační aktivita paraoxonasy 1 (PON1).

Metody: DNA byla získána z leukocytů venózní krve konvenčním postupem izolace. Analýza byla provedena metodou PCR- RFLP na 109 osobách s DM 2. typu (dle kritérií WHO) a 80 zdravých kontrolách. Byly změřeny následující biochemické parametry: glykémie nalačno 9,29±3,09 mmol/l, koncentrace triacylglycerolů 1,91±0,32 mmol/l, LDL-cholesterolu 3,22±0,78 mmol/l a glykovaný hemoglobin 6,65±1,76 % u diabetiků, glykémie nalačno 4,95±0,49 mmol/l, koncentrace triacylglycerolů 1,43±0,63 mmol/l, LDL cholesterolu 3,00±0,66 mmol/l ve skupině zdravých kontrol. U všech sledovaných byla exkrece albuminu močí v mezích normy. Rozdíl ve věkové distribuci a zastoupení pohlaví nebyl mezi oběma skupinami statisticky významný. Zaměřili jsme se na 2 SNP v kódující oblasti genu (L55M,Q192R) a 2 SNP v promotorové (-107C/T, -907 G/C).

Výsledky: Výsledkem bylo zjištění statisticky významného rozdílu v četnosti výskytu alel L/M v pozici 55 (P=0,01) a Q/R v pozici 192 genu PON1 (P=0,01). V souboru diabetiků byly četnosti alel následující: L=0,583, M=0,417, naproti tomu u kontrol L=0,850, M=0,150. V případě polymorfismu Q192R pak Q=0,849, R=0,151 u DM 2. typu a Q=0,543, R=0,457 u kontrol. V promotorové oblasti nebylo mezi oběma soubory shledáno ani u jednoho ze studovaných SNP statisticky významného rozdílu.

Závěr: Výsledky šetření ukazují na to, že studované polymorfismy kódující oblasti genu pro paraoxonasu 1 mohou být genetickými faktory asociovanými s diabetem mellitem 2. typu.

ZMĚNY ENDOKRINNÍ FUNKCE TUKOVÉ TKÁŇE U MORBIDNĚ OBÉZNÍCH PACIENTEK A PACIENTEK S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ

Autor: MUDr. Petra Kleiblová

Školitelé: Doc. MUDr. Pavel Calda, CSc., Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN,
Doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc., III. interní klinika – klinika endokrinologie
a metabolismu 1. LF UK a VFN

V posledních letech bylo prokázáno, že tuková tkáň vytváří řadu hormonálně aktivních látek, ovlivňujících energetický metabolismus. Poruchy v syntéze či aktivitě těchto tzv. adipocytárních hormonů (adipocytokinů) se spolupodílejí na vzniku různých metabolických syndromů. Zvláště intenzivně je studován jejich možný podíl na vzniku a rozvoji inzulinové rezistence.

Cílem práce bylo charakterizovat expresi adipocytokinů (adiponectin, leptin, resistin) v bílé tukové tkáni na úrovni mRNA a porovnat sérové koncentrace těchto hormonů u dvou extrémních poruch nutričního stavu: 12 pacientek s morbidní obezitou (BMI > 40 kg/m²), 10 pacientek s mentální anorexií (BMI < 17,5 kg/m²). Kontrolní skupinu tvořilo 10 zdravých štíhlých žen. Vzorky subkutánní tukové tkáně byly odebrány biopsií, genová exprese byla měřena pomocí kvantitativního PCR v reálném čase. Relativní kvantifikace genové exprese sledovaných adipocytárních hormonů byla provedena pomocí softwaru REST-XL. Koncentrace adipocytokinů v séru byly stanoveny komerčními ELISA a RIA kity.

Sérové koncentrace leptinu pozitivně korelovaly s BMI u všech sledovaných skupin, zatímco koncentrace adiponectinu korelovaly s BMI negativně. Koncentrace resistinu se mezi sledovanými skupinami nelišily. Exprese leptinu v podkožní tukové tkáni byla v porovnání s kontrolní skupinou u obezních pacientek významně zvýšena (6,8×; p=0,002) a u mentálních anorektiček snížena (1,7×; p=0,52). Exprese adiponectinu byla přibližně 1,5× nižší u pacientek s obezitou i mentální anorexií ve srovnání s kontrolní skupinou.

Naše výsledky ukazují, že sérové hladiny leptinu a adiponectinu korelují s hodnotami BMI, zatímco sérové hladiny resistinu nejsou patrně nutričním stavem primárně regulovány. V případě leptinu odpovídají změny jeho genové exprese dynamice změn proteinu v séru, avšak exprese adiponectinu je u mentálních anorektiček snížena, přestože jeho koncentrace v séru jsou vysoké. Zvýšené koncentrace adiponectinu mohou být důsledkem jeho zpomalené metabolizace či jiného mechanismu relativně nezávislého na regulaci genové exprese.

Podporováno projektem MSM 0021620814

DYNAMIKA DIFERENCIACE PODOCYTŮ V PRIMOKULTUŘE

Autoři: MUDr. Jan Krtíl, Markéta Kazderová

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Úvod: Podocyty (viscerální glomerulární epiteliální buňky) jsou terminálně diferencované epiteliální buňky, které zevně naléhají na bazální glomerulární membránu. Poškození těchto buněk vede k rozvoji proteinurie, resp. nefrotického syndromu. Jednou z používaných metod ke studiu podocytů jsou in vitro kultivované primární linie těchto buněk. Předpokládá se, že v primokultuře dochází nejprve k dediferenciaci a proliferaci a později opět k diferenciaci podocytů do terminálního fenotypu. Dynamika těchto změn však doposud nebyla studována. Cílem naší práce bylo zjistit, jak se v primokultuře podocytů mění v průběhu času exprese proteinů charakterizujících diferenciaci a proliferaci těchto buněk.

Metodika: Glomeruly izolované z potkanů kmene Wistar (samci, 150–170 g) byly kultivovány po dobu jednoho týdne. Podocyty proliferující z glomerulů byly odděleny a následně samostatně kultivovány po dobu čtyř týdnů. Na začátku samostatné kultivace podocytů a dále ve čtyř jednotýdenních intervalech byly sledovány následující parametry: počet buněk v kultuře, metabolická aktivita buněk MTT testem, exprese proteinů WT-1, PCNA, synaptopodin imunofluorescencí a exprese PCNA Western blotem.

Výsledky: V průběhu kultivace došlo ke snížení počtu i metabolické aktivity buněk, dále ke změně distribuce exprimovaného synaptopodinu, a to z perinukleární na cytoplazmatickou, a konečně k plynulému poklesu exprese PCNA.

Závěr: Podocyty v primokultuře snižují proliferační aktivitu a získávají znaky diferencovaného fenotypu.

AUTOMATIZOVANÝ POČÍTAČOVÝ ALGORITMUS DÁVKOVÁNÍ INZULÍNU U KRITICKY NEMOCNÝCH PACIENTŮ

Autoři: MUDr. Jaromír Křemen¹, Bláha J.², Anderlová K.¹, Svačina Š.¹, Hovorka R.³, Haluzík M.¹

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

Úvod: U kriticky nemocných pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče se velmi často vyskytuje hyperglykémie. Nedávná rozsáhlá studie Van den Berge prokázala, že intenzifikovaná inzulinová terapie snižuje mortalitu u pacientů hospitalizovaných na JIP po kardiochirurgických výkonech až o 42 % oproti standardní terapii.

Metodika: Cílem naší substudie, která je součástí projektu 6. RP EÚ CLINICIP (Closed Loop Insulin Infusion for Critically Ill Patients), bylo porovnat standardní protokol inzulinoterapie k udržení glykémie v hodnotách 4,4–6,1 mmol/l používaný na JIP u pacientů po kardiovaskulárních operacích a počítačový algoritmus MPC (Model Predictive Control) vyvíjený pro plánovaný automatizovaný systém CLINICIP. Do studie bylo zařazeno 20 pacientů s glykemií při příjmu na JIP vyšší než 6,7 mmol/l (diabetici i nediabetici, obě pohlaví), 10 subjektů bylo randomizováno pro léčbu podle standard-



ního protokolu, 10 pro léčbu pomocí MPC algoritmu. Glykemie byly měřeny v hodinovém intervalu po dobu 48 hodin, u MPC algoritmu byla rychlost inzulínové infuze upravována po 1 hodině, u standardního protokolu po 1–2 hodinách. Hodnotili jsme následující ukazatele: dobu, po kterou byla glykémie udržována v cílových hodnotách, dobu, po kterou byli pacienti v hyperglykémii (>8,3 mmol/l), dobu nutnou k dosažení cílových mezí, průměrnou glykémii, spotřebu inzulínu za 48 hod a počet hypoglykemických epizod (glykémie <2,9 mmol/l).

Výsledky: MPC algoritmus udržel glykémii v cílových mezích déle než standardní protokol (26,3±2,1 h vs 20,3±2,5 h), rovněž průměrná glykémie byla při použití MPC algoritmu nižší (6,47±0,11 vs 6,72±0,23 mmol/l). Oproti tomu použití standardního algoritmu umožnilo rychlejší dosažení cílových hodnot glykémie (8,9±1,2 vs 10,3±0,9 h). Doba, po kterou se u pacientů vyskytovala hyperglykémie, se u obou algoritmů nelišila (7,3±1,9 u standardního protokolu vs. 7,3±1,3 h u MPC algoritmu), průměrná spotřeba inzulínu byla vyšší při použití MPC algoritmu (230,2±38,8 vs 199,1±27,8 IU/48 h). U dvou pacientů léčených pomocí standardního protokolu jsme zaznamenali po jedné hypoglykemické epizodě.

Závěr: Naše výsledky ukazují, že použití MPC algoritmu vede k lepší kontrole glykémie u kriticky nemocných pacientů než standardní protokol.

Studie byla podporována 6. rámcovým projektem EU CLINICIP

STUDIUM PATOGENETICKÝCH DŮSLEDKŮ 6 MUTACÍ UROMODULINU PODMIŇUJÍCÍHO FAMILIÁRNÍ JUVENILNÍ HYPERURIKEMICKOU NEFROPATII (FJHN)

Autoři: Mgr. Martina Kublová¹, Petr Vyleťal¹, Kateřina Hodaňová¹, Marie Kalbáčová¹, Veronika Barešová¹, Jan Živný², Stanislav Kmoch¹

¹Centrum aplikované genomiky, Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN,

²Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK

Školitel: Stanislav Kmoch, ÚDMP, 1. LF UK a VFN

Familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN) (OMIM 162000) je autozomálně dominantní ledvinné onemocnění charakterizované juvenilní hyperurikémií a dnovou artritidou. Onemocnění progreduje ve 3.–5. dekádě života a vede k renální insuficienci. FJHN je geneticky heterogenní. Jednou z příčin onemocnění jsou mutace v genu pro Tamm-Horsfallův protein, uromodulin (UMOD) lokalizovaném na chromosomu 16p11.2. V naší studii jsme analyzovali *UMOD* gen v 19 FJHN rodinách. V 6 rodinách jsme našli onemocnění podmiňující mutace – Cys32Tyr, Cys126Arg, Met229Arg, Pro236Leu, Val273Phe a Cys317Tyr. Patogenetický mechanismus nalezených mutací jsme studovali metodou exprese rekombinantních proteinů v myších buňkách AtT20. Sledovali jsme dynamiku a míru expozice UMOD na plazmatické membráně buněk (průtoková cytometrie), stupeň post-translační modifikace (Western blot) a lokalizaci proteinu v buňce (fluorescenční konfokální mikroskopie).

Experimenty ukázaly, že všechny nalezené mutace vedou k různé míře postižení transportu a expozice proteinu na plasmatickou membránu. Různá míra postižení je následkem odlišné schopnosti správného sbalování a nedostatečné post-translační modifikace jednotlivých proteinů a s jejich následnou retencí v endoplasmatickém retikulu, Golgiho aparátu či transportních vácích.

Naše výsledky umožnily DNA diagnostiku v postižených rodinách, potvrdily že FJHN je geneticky heterogenní onemocnění a naznačily, že různá tíže klinického postižení pozorovaná u jednotlivých rodin může odrážet odlišné patogenetické důsledky onemocnění podmiňující mutace.

7-ALFA-HYDROXY-4-CHOLESTEN-3-ON, NOVÝ MARKER MALABSORPCE ŽLUČOVÝCH KYSELIN, U PACIENTŮ S CROHNOVOU CHOROBOU

Autoři: MUDr. Martin Leníček, Lenka Dudková, Stanislav Adamec, Milan Lukáš, Libor Vítek

Školitel: Doc. MUDr. Libor Vítek, Ph.D., MBA, ÚKB LD 1. LF UK a VFN

Úvod: U pacientů s Crohnovou chorobou (CD) často dochází k malabsorpci žlučových kyselin, která přispívá ke vzniku některých komplikací, jako například zvýšené prevalenci pigmentové cholelitiázy. V předkládané studii byla ve skupině pacientů s CD stanovena sérová koncentrace 7-alfa-hydroxy-4-cholesten-3-onu (cholestenu), nového markeru malabsorpce žlučových kyselin.

Metodika: Sérové koncentrace cholestenu byly stanoveny ve skupině pacientů s CD po ileální resekcí (n=34), se zánětlivým postižením ilea (n=16), s postižením pouze tlustého střeva (CD+UC, n=10) a u zdravých kontrol (n=43). Cholesten byl extrahován na SPE C8 kolonce při 64 °C, eluován směsí hexan:chloroformu (95:5), vysušen dusíkem a rozpuštěn v acetonitrilu. Vzorky byly rozděleny pomocí HPLC (na koloně SGX C18, 40×250 mm, velikost částic 4 μm) s mobilní fází acetonitril:voda (95:5) a detegovány při 241 nm.

Výsledky: Pacienti s CD po resekcí ilea měli signifikantně vyšší sérové koncentrace cholestenu [medián 119,4 ng/ml (min 11,8–max 437,8)] než zdravé kontroly [12,5 (2,7–30,4)] p<0,001. Mírně zvýšená hladina cholestenu byla pozorována i u pacientů s ileitidou [17,9 (3,4–189,3)], nicméně rozdíl není statisticky významný (p=0,051). Postižení tlustého střeva nemá na hladinu cholestenu vliv.

Závěr: Sérová koncentrace cholestenu se zdá být spolehlivým markerem malabsorpce žlučových kyselin u pacientů s CD a velmi dobře koreluje s tíží postižení terminálního ilea. Pro posouzení významu tohoto markeru jakožto prediktoru rizika pigmentové cholelitiázy je zapotřebí dalšího výzkumu.

REGULATION OF GENE EXPRESSION BY THYROID HORMONE RECEPTORS IN HUMAN GLIAL TUMOURS AND A GLIOBLASTOMA CELL LINE U373

Authors: MUDr. Petr Libý, Michal Pohludka, Marta Kostrouchova, Zdenek Kostrouch

Advisor: MUDr. Zdenek Kostrouch, CSc., Laboratory of Molecular Pathology, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Thyroid hormone plays a crucial role in brain development. Contrary to that, thyroid hormone receptors are dispensable for brain development in knock-out animals, indicating that unliganded receptors are the cause of the developmental defect. The regulation by thyroid hormone receptors is dependent not only on the ligand but also on interacting transcription cofactors.

In this project, we attempted to characterize and quantify the expression of thyroid hormone receptors in glial tumors, control samples and an astrocytoma cell line, the U373.

On the mRNA level, thyroid hormone receptors TR α 1, TR α 2 and TR β of expected sizes were amplified from all examined cases. Quantification analysis was performed on a group of diffuse astrocytomas – grade II (4 cases), glioblastoma multiforme – grade IV (4 cases) and one sample of epileptic tissue removed for therapeutic purposes. All samples had a similar pattern with relative expression close to ratios $64 \times \text{TR}\alpha 2 > 16 \times \text{TR}\beta 1 > 1 \times \text{TR}\alpha 1$. Additional experiments designed to quantify the expression using calibrated quantitative PCR are currently in process.

Western blot revealed expression of multiple immunoreactive proteins of sizes smaller as well as bigger than transfected human thyroid hormone receptor TR α 1. On the cellular level, glial tumors showed strong expression of anti-TR α 1 antibody immunoreactive proteins in nuclei as well as in the cytoplasm. TR α 2 immunoreactive proteins are localized predominantly in the cytoplasm. Similar expression pattern was found in U373 glioblastoma cell line. The nature of immunoreactive proteins and their relation to TR α 1 have to be determined. Transfection experiments show that thyroid receptors in U373 cells are capable of transcription activation from thyroid responsive promoters but exogenous receptors are necessary for efficient activation of exogenous thyroid responsive promoters. Our results indicate that thyroid receptors TR α 1, TR α 2 and TR β are expressed in glial tumours but their subcellular localization and their functionality may be impaired. We are conducting experiments aimed to characterization of thyroid receptors on protein level and identification of interacting proteins.

STUDY OF THE DYNAMICS OF NO IN THE BACTERIAL NOS-LIKE PROTEINS FROM BACTERIAL PATHOGENS *BACILLUS ANTHRACIS* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Authors: Ing. Ivan Mikula¹, Clément Gautier², Jean-Christophe Lambry², Pierre Nioche³, Pavel Martásek¹, C.S. Raman³ and Anny Slama-Schwok²

Advisor: Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., ¹ Department of Pediatrics And Center for Applied Genomics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, ² Laboratory of Optics and Biosciences, INSERM U451, France, ³ Dept. Biochemistry & Molecular Biology, University of Texas Medical School, Houston, Texas, USA

Some Gram-positive bacterial pathogens harbor a gene that encodes a protein (HNS, Heme domain NO Synthase-like) with striking sequence identity to the heme domain of mammalian NO synthases (NOS). Unlike the latter, however, a diflavin containing reductase domain is not covalently fused to HNS. Interestingly, HNS lacks the N-terminal Zn²⁺ – chelating domain characteristic for mammalian NOSs and ability to bind tetrahydrobiopterin. Currently, there is no incontrovertible direct proof that HNS is capable of generating NO under physiological conditions. Nevertheless, the unique properties of HNS make it an excellent model system for probing how the heme environment tunes NO dynamics and comparing it to a mammalian NOS (eNOS_{HD}). We have utilized ultrafast transient spectroscopy to probe NO binding in HNS from *Bacillus Anthracis* (BA) and *Staphylococcus Aureus* (SA).

NO rebinding in HNS-SA is much faster than that measured in either HNS-BA or eNOS_{HD} in both oxidized and reduced forms in the presence of arginine. We tested whether these distinct rates could arise from different energy barriers for NO recombination by measuring rebinding kinetics at various temperatures. The data are consistent with a high energy barrier for recombination of (5,2±0,9 kcal.mol⁻¹) that isolates the second site from the heme in HNS-SA. In contrast, a second site is coupled to the heme and separated by a low energy barrier of (3,1±0,7 kcal.mol⁻¹) in HNS-BA. The hypothesis of a second NO site in the latter also consistent with the effect of the NO concentration on NO rebinding, similar to that found in eNOS_{HD}. This effect is lacking in HNS-SA probably because of its high energy barrier isolating this site from the heme. The accessibility of this site to NO ligands is discussed in the context of cavities often found in hemoproteins. Our work suggests that the substrate and cofactor, via their extensive H-bonds network with the heme, control NO release from eNOS_{HD}.

Supported by grant GAUK 21/C/2004



DEGENERACE NEURONŮ PO PERORÁLNÍM ABUSU ALKOHOLU U POTKANŮ

Autoři: Mgr. Martina Milotová, MUDr. Vladimír Riljak

Školitel: Prof. MUDr. Miloš Langmeier DrSc., Fyziologický ústav 1. LF UK

Úvod: Experiment směřuje k objasnění vlivu ethanolu, jako neurotoxické látky, na vývoj populací neuronálních a gliálních buněk v hippocampu. Tato studie by mohla přispět k objasnění poškození mozku během ontogenetického vývoje.

Metodika: Březím samicím laboratorních potkanů typu Wistar byl od od 1. dne březosti do odstavení mládřat (30 dní ode dne porodu) podáván p.o. 20% roztok ethanolu. To znamená, že mládřata byla vystavena expozici alkoholu během prenatalního i postnatalního vývoje (v mateřském mléce). 15 zvířat bylo 18. den a 15 zvířat bylo 35. den postnatalního vývoje, v hluboké pentobarbitalové narkóze, transaortálně perfundováno (neutrálním roztokem paraformaldehydu), jejich mozky vyjmuty a zpracovány na kryostatu. Následně byly řezy obarveny kombinací DNA barvení Hoechst a Fluoro-Jade B (to umožňuje identifikovat zanikající neurony). Preparáty byly hodnoceny ve světelném mikroskopu Olympus AX 70 s epifluorescencí.

Výsledky: U zvířat usmrčených 18. i 35. den postnatalního vývoje jsme se především zaměřili na morfologické změny v oblastech hippocampu: CA1, CA3 a gyrus dentatus. V těchto oblastech bylo možné pozorovat skupiny stále degenerujících buněk. Dále jsme v hlavně ve ventrálním listu oblasti gyrus dentatus identifikovali buňky s jemně granulovanými jádry a velké množství glie.

Závěr: U všech zvířat, která byla vystavena současně prenatalní a postnatalní expozici 20% ethanolu, byly v oblastech hippocampu CA1, CA3 a gyrus dentatus jasně patrné morfologické změny neuronálních a gliálních buněk. Pozoruhodné bylo zjištění, že i třicetpět dní od prenatalní expozice 20% ethanolu, zde bylo možné pozorovat ještě degenerující buňky, což svědčí o nastartování určitého procesu, pravděpodobně apoptózy. Apoptickému mechanismu zániku neuronálních a gliálních buněk by nasvědčovala i identifikace buněk s jemně segmentovanými jádry. V ostatních oblastech hippocampu bylo také možné pozorovat morfologické změny neuronálních a gliálních buněk.

ZMĚNĚNÁ VÝKONNOST VE VODNÍM BLUDIŠTI U MYŠÍ SOUVISÍ SE ZMĚNAMI DIFÚZNÍCH PARAMETRŮ V MEZIBUNĚČNÉM PROSTORU MOZKU

Autoři: MUDr. Michael Ort^{1,2}, Voříšek, I.^{3,4}, Antonova, T.^{3,4}, Mazel, T.^{3,4}, Meyer-Luehmann, M.⁵, Jucker, M.⁵, Hájek, J.⁶, Syková, E.^{3,4}, Bureš, J.¹

¹Laboratoř neurofyziologie paměti, Fyziologický ústav AV ČR, ²Psychiatrická klinika 1. LF UK v Praze, ³Oddělení neurověd, Ústav experimentální medicíny AV ČR, ⁴Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, 2. LF UK v Praze, ⁵Neuropatologické oddělení, Ústav pro neuropatologii University v Basileji, ⁶Radiologické oddělení, IKEM Praha

Školitelé: MUDr. Jan Bureš, DrSc., Laboratoř neurofyziologie paměti, FgÚ AV ČR, Prof. MUDr. Petr Zvolský, DrSc., Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Poškození intelektových funkcí u Alzheimerovy demence (AD) se ponejvíce přičítá úbytku neuronů a změnám v interneuronálním přenosu u postižených osob. Interneuronální přenos se odehrává jednak na synapsích, a jednak mimo ně. V naší práci jsme se zabývali difúzí látek v mezibuněčném prostoru (ECS), která je základem nesynaptické přenosu signálů odehrávajícím se mimo interneuronální synapse.

Metodika: Studovali jsme parametry mezibuněčné difúze u transgenních myší APP23, a to u myší starých 6 a 18 měsíců. Pomocí elektrofyziologických (iontoforéza v reálném čase) a zobrazovacích (NMR) metod jsme určili koeficienty difúze pro molekuly TMA (tetramethylammonium, neproniká z ECS do buněk) a vody (která buněčnými stěnami naopak proniká). Ze získaných výsledků jsme dopočítali podíl mezibuněčného prostoru z celkového objemu mozku (frakce ECS). V mozku testovaných myší byl poté imunohistochemicky stanoven rozsah amyloidových plaků.

Výsledky: U mladých myší se měřené parametry transgenních myší nelišily od kontrol. U starých myší, u kontrol, došlo k poklesu frakce ECS (z 20 na 15 %) a ke snížení difúze vody (o 10 % oproti mladým myším) a tato snížení byla u samic výraznější nežli u stejně starých samců; difúze TMA se u kontrol s věkem nezměnila. U starých transgenních myší se naopak frakce ECS zvýšila, (z 20 na 22 %), stejně tak difúze vody, difúze TMA se snížila. U těchto transgeniků byla difúze TMA nižší u samic nežli u samců a korelovala se zvýšením rozsahu amyloidových plaků v mozku samic (20 % u samic, ale jen 10 % u samců) a se zhoršením jejich výkonnosti v Morrisově vodním bludišti oproti samcům.

Diskuse: V mezibuněčné matrix stárnoucích jedinců dochází k degradaci molekul zadržujících vodu, a tím dochází ke zmenšení frakce ECS. Přicházíme s představou, že přítomnost částic amyloidu v mozku působí v opačném smyslu, amyloid zadržuje vodu (zvětšuje frakci ECS) a zároveň působí jako překážka volné difúzi neurotransmitterů. Obojí vede ke zhoršení synaptického přenosu a k deficitu mozkové výkonnosti.

Závěr: Je tedy lze vyslovit domněnku, že na poškození intelektových funkcí u AD se podílejí i změny charakteristik mezibuněčného prostoru CNS a difúze látek v něm.

Podpořeno granty: GAČR AVOZ5039906, MŠMT LN00A65 a J13/98111300004

ASSEMBLY INTERMEDIATES OF CYTOCHROME *C* OXIDASE IN VARIOUS TISSUES OF PATIENTS WITH *SCO2* AND *SURF1* MUTATIONS

Authors: Mgr. Lukáš Stibůrek, K. Veselá, H. Hansíková, P. Pecina, M. Tesařová, L. Černá, J. Houštek, J. Zeman

Advisor: Prof. MUDr. Jiří Zeman DrSc., KDDL and Center of Applied Genomics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Eukaryotic cytochrome *c* oxidase (COX) is a multimeric inner mitochondrial membrane protein complex encoded by both the mitochondrial and nuclear genomes. Assembly of the mammalian enzyme requires several assembly factors in addition to the structural subunits and prosthetic groups. We studied various tissues and fibroblast cultures from six patients with mutations in COX assembly factors *SCO2* and *SURF1*. *SCO2* is copper-binding protein presumably involved in formation of the Cu_A center of COX2. The function of *SURF1* is unknown. Immunoblot analysis of native gels demonstrated severely decreased COX holoenzyme levels in skeletal muscle and brain of *SCO2* and *SURF1* patients and in heart of *SCO2* patients, whereas fibroblasts and particularly liver of *SCO2* patients were only moderately affected. The *SCO2* protein levels were severely reduced in all probed *SCO2* patient samples. COX subcomplexes and unassembled subunits were found accumulated in patient tissues, some of them apparently identical to known assembly intermediates of human enzyme. Heart, brain and skeletal muscle of *SCO2* patients contained increased levels of COX1•COX4•COX5A subcomplex, three COX1-containing subcomplexes, COX4•COX5A subcomplex and two subcomplexes composed of single COX4 or COX5A. The overall pattern and subunit composition of subcomplexes identified, confirms the role of human *SCO2* in biogenesis or maintenance of COX2. The detection of COX4•COX5A subcomplex suggests that the association of these nucleus-encoded subunits might precede their addition to COX1 during the complex assembly. We speculate that tissue-specific consequences of *SCO2* and *SURF1* mutations, along with quite dissimilar levels of assembly intermediates found in various control tissues, suggest the existence of tissue-specific differences in human COX assembly process.

Supported by GAUK 17/2004/C/1.LF, GACR 303/03/H065

PARALLEL PHENTERMINE LEVELS IN BLOOD SERUM AND SALIVA COLLECTED BY SALIVETTE

Authors: Mgr. Miroslava Szkutová, V. Habrdová, M. Balíková, M. Matoulek, Š. Svačina

Advisor: Doc. Ing. Marie Balíková, CSc., Ústav Soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN

For some years, oral fluid samples have been attracting the attention for detection of psychoactive substances in impaired drivers for their non-invasive collection under direct observation and for the expectation that saliva drug levels may reflect psychomotoric state of a driver more closely than in urine. We have used the opportunity to study the partition of phentermine, the structural isomer of methamphetamine, between blood and saliva in human patients under therapeutic treatment. Blood and saliva of patients on therapy with 15 mg phentermine p.o. daily were collected 2.5 hours after morning dose. For saliva collection, neutral and citric acid types of Sarstedt Salivette have been chewed for 3 min within 5 min interval. Phentermine in samples was assayed by GC-MS validated methods. The saliva sample volumes were sufficient but variable in the range 1–3 ml without significant differences in obtained volumes between two types of Salivette. The mean concentration ratio saliva/serum was 6.1 at the first saliva collection. After repeating the collection using Salivette with citric acid, the ratio saliva/serum dropped to 1.4. Even if the exact volume of oral fluid collected in the described way was beyond our control and varied with impact on concentration, this study has supported the idea that saliva can be convenient sample for detection of basic drugs reflecting serum concentration in parallel, with higher concentration than in serum. Therefore, oral fluids may allow broader detection window in time after the dose.

NUCLEAR HORMONE RECEPTOR 60 IS INVOLVED IN *CAENORHABDITIS ELEGANS* EMBRYONIC DEVELOPMENT AND IS LOCALIZED IN NUCLEAR PERIPHERY

Authors: Mgr. Kateřina Šimečková, Eva Brožová, Zdeněk Kostrouch, Marta Kostrouchová

Advisor: MUDr. Marta Kostrouchová, CSc., Laboratory of Molecular Biology and Genetics, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

C. elegans nuclear hormone receptors (NHRs) that are distantly homologous to vertebrate retinoid receptors may be divided according to their region directly involved in the contact with DNA, the P box. We are studying NHRs that are characterized by the P box sequence CNGCKT. Here, we present our results on NHR-60, a receptor that contains 11 amino acids in the inner part of the second zinc finger. This region is likely to be involved in the dimerization or association of NHR-60 with other functionally connected proteins.

We find that NHR-60 appears to be expressed as only a single isoform. The expression of *nhr-60* starts in embryos and continues throughout the development. Transgenic lines carrying *nhr-60::GFP* transcriptional fusion protein show expression in seam cells, pharyngeal gland cells and ray cells of the male tail. By RNA interference and by using transgenic lines carrying mutated constructs from heat shock regulated promoter, we found that NHR-60 first functions during



embryogenesis. NHR-60 specific antibodies, raised in rabbits, detected NHR-60 predominantly in the nuclear periphery at the nuclear lamina. This is a surprising localization for a NHR.

STUDIUM ZMĚN PROTEINŮ V MOČI 2D ELEKTROFORÉZOU

Autor: Ing. Lucie Vojtová

Školitel: Prof. Tomáš Zima DrSc., MBA, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Proteinurii nacházíme u řady onemocnění ledvin a je často spojena s nefrotickým syndromem. Nefrotický syndrom je klinicko-laboratorní syndrom charakterizovaný velkou proteinurií, hypoproteinémií, edémy, hypercholesterolémií a lipidurií. Proteinurie je způsobena zvýšenou permeabilitou glomerulární bazální membrány (změna náboje membrány), poškozením membrány, podocytů a narušením sekrečně-reabsorbčních tubulárních pochodů. U proteinurií není dosud známo přesné složení modifikovaných či degradovaných proteinů v moči, ale předpokládá se jejich možný toxický vliv na tubulární buňky a progresi onemocnění. Práce je zaměřena na studium změn proteinů v souvislosti s nefrotickým syndromem a jeho možným ovlivněním terapií pomocí moderních analytických technik.

V současné době jsme zavedli techniku 2D elektroforézy. Proteiny jsou nejprve děleny na základě izoelektrických bodů metodou izoelektrické fokusace s využitím komerčně připravených 7 cm polyakrylamidových stripů s imobilizovaným lineárním gradientem pH 3–10. Následně jsou separovány SDS-elektroforezou v polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti. Vizualizace rozdělených proteinů je prováděna stříbrem nebo coomassie blue.

Pro účely analýzy proteinů v moči je na základě našich výsledků vhodná metoda izoelektrické fokusace s celkovým počtem 124 kVh a SDS elektroforezou v 12% homogenním polyakrylamidovém gelu. Celkové množství proteinů nanesené na strip je 50 µg. Ve vybraných vzorcích jsme našli zajímavé rozdíly u proteinurie do 5 g/l, kde se vyskytují proteiny o molekulové hmotnosti 12 kDa a hodnotě izoelektrického bodu 9, které však u proteinurií do 10 g/l nenalzáme.

Byla zavedena a optimalizována metoda 2-D elektroforezou proteinů v moči a předběžné výsledky svědčí pro rozdíly spektra proteinů při různých závažných proteinuriích. Vybrané izolované proteiny budou dále identifikovány pomocí MALDI-TOF MS ve spolupráci s FPBT VŠCHT.

ADJUVANTNÍ IMUNIZACE MYŠÍ INAKTIVOVANÝM CHŘIPKOVÝM VIREM (A A B) CESTOU RESPIRAČNÍHO TRAKTU

Autoři: Mgr. Peter Zanvit, M. Havlíčková, M. Jirkovská a L. Prokešová

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

Úvod: Slizniční imunizace inaktivovaným virem často nevede k navození dostatečné imunitní odpovědi, proto je snaha posílit imunitní odpověď pomocí vhodného adjuvans. My jsme použili jako adjuvans G+ nepatogenní bakterii *Bacillus firmus* (BF) s výraznými imunostimulačními vlastnostmi jako adjuvans pro imunizaci myší inaktivovaným chřipkovým virem.

Metody: Myši BALB/c byly imunizovány intratracheálně (IT) nebo intranasálně (IN) pomocí formaldehydem inaktivovaných virů chřipky B/Sichuan 379/99, B/Yamanashi/166/98, B/Lee/40 a A/PR/8/34. Jako adjuvans byl použit formaldehydem inaktivovaný BF nebo delipidovaný BF (DBF). Po imunizaci byla měřena hladina protilátek v séru a sekretech pomocí metody ELISA. Lokální odpověď v plicích byla sledována histologicky. Hladina cytokinů byla měřena pomocí real-time PCR.

Výsledky: Imunizace samotným inaktivovaným virem chřipky B nevede k navození dostatečné imunitní odpovědi. Použití BF a zvláště DBF jako adjuvans vedlo k významné protilátkové odpovědi, jak systémové tak slizniční. Imunizace samotným inaktivovaným virem chřipky A navozuje uspokojivou protilátkovou odpověď, efekt adjuvans byl nicméně patrný. IT imunizace vyvolala vysoké hladiny protilátek v plicích, zatímco IN imunizace navodila produkci protilátek jak v plicích tak i ve střevě. Imunizaci docházelo také k zvyšování hladin cytokinů v plicích. *In vivo* experimenty potvrdili výrazný protektivní efekt imunizace. Výrazná křížová protekce proti značně odlišnému kmenu B/Lee byla pozorována po imunizaci virem B/Yamanashi.

Závěr: BF/DBF se jeví jako velmi účinné adjuvans pro imunizaci myší inaktivovaným chřipkovým virem cestou respiračního traktu.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České Republiky 310/02/0467 a 310/03/H147

CHARACTERIZATION OF *CAENORHABDITIS ELEGANS* MUTANT STRAIN RB839

Authors: Ing. Eva Zouharová, M. Kostrouchová, J. Krijt, V. Kožich

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

C. elegans is a widely used model organism. The aim of our ongoing study is to examine whether the genetically modified *C. elegans* strains may be suitable models for studying disorders of homocysteine metabolism. As deficiency of cystathionine beta-synthase (CBS) is the main cause of homocystinuria in humans, we first started to characterize *C. elegans* strain RB839, in which a part of the F54A3.4 gene- an ortholog of human CBS- has been deleted.

Sequencing of genomic DNA obtained from RB839 revealed deletion between nucleotides 857 and 1548, which predicts an in-frame deletion of 231 amino acids in the putative active core of the enzyme. Subsequently we characterized the

phenotype of RB839 nematodes. The body morphology, behaviour, lifespan and egg-laying of RB839 hermaphrodites did not differ from the wild-type N2 nematodes. We also determined the CBS activity in RB839 strain, which did not significantly differ from the control strain N2, suggesting that F54A3.4 gene does not serve as cystathionine beta-synthase in *C.elegans*. This notion is also supported by the lack of difference in concentration of homocysteine and other aminothiols in crude extracts of RB839 and wild type N2 strains.

These preliminary data show that the strain RB839 with deleted part of F54A3.4 gene- an ortholog of human CBS- may not be a proper model for studying human CBS deficiency. However, our study suggests that the F54A3.4 gene may confer other functions in nematode sulphur metabolism.

This study was supported by The Wellcome Trust Senior Fellowship to V. K.



Studenti při konferenci.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ POSTERY



ABSTRAKTA PRACÍ ÚČASTNÍKŮ

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ postery

- Beran Ondřej, MUDr., 3. r.
- Broučková Adéla, Ing., 2. r.
- Buzková Helena, Mgr., 1. r.
- Bysterská Petra, Mgr., 1. r.
- Čížek Zdeněk, Ing., 2. r.
- Fábín Petr, Mgr., 1. r.
- Fraško Roman, MUDr.
- Glierová Hana, Mgr. 1. r.
- Himmerová Veronika, MUDr., 2. r.
- Jatchvlíani Dato, MUDr.
- Klempíř Jiří, MUDr., 2. r.
- Kučera Robert, MUDr., 1. r.
- Kutinová-Canová Nikolína, MUDr., 5. r.
- Lačňák Zdeněk, MUDr.
- Lenčová Erika, MUDr., 3. r.
- Machovcová Alena, MUDr., 1. r.
- Panigaj Martin, Mgr., 2. r.
- Pavlíček Alexandr, Mgr., 1. r. PŘF
- Pechandová Kristýna, Mgr., 1. r.
- Podzimek Štěpán, Mgr., 3. r.
- Riljak Vladimír, MUDr., 1. r.
- Spišáková Martina, Mgr., 3. r.
- Szkutová Miroslava, Mgr., 1. r.
- Vaňková Zdeňka, MUDr., 1. r.
- Žižka Jan, Mgr., 2. r.

HODNOTITELSKÁ KOMISE

- Předseda:** Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.
Členové: Doc. MUDr. Ivan Matouš-Malbohan, CSc.
Odb. as. MUDr. Debora Karetová, CSc.
Prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.



ZÁNĚTLIVÉ POŠKOZENÍ MOZKU PŘI BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDĚ: ROLE CYTOKINŮ A KORTISOLU

Autoři: MUDr. Ondřej Beran, Jarmila Hnyková, Olga Džupová, Zdenka Lacinová, Michal Holub
Školitel: MUDr. Michal Holub, Ph.D., III. klinika infekčních a tropických nemocí 1. LF UK a FN Na Bulovce

Úvod: Navzdory pokrokům v antibiotické terapii je bakteriální meningitida (BM) onemocněním s významnou mortalitou a morbiditou. V patogenezi tohoto závažného onemocnění hraje důležitou roli nadměrná imunitní odpověď v subarachnoideálním prostoru. Záměrem studie byla analýza produkce zánětlivých cytokinů a kortisolu v likvoru u pacientů s BM a posoudit význam těchto parametrů v patofyziologii BM a možnost jejich využití jako klinických markerů onemocnění.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 25 pacientů s diagnózou BM, která byla stanovena na základě likvorového nálezu. U pacientů byla rovněž provedena kontrolní lumbální punkce za 4 až 5 dní. V párových vzorcích likvoru a séra byly vyšetřeny koncentrace cytokinů a kortisolu. Pro hodnocení tíže průběhu BM bylo využito systémů APACHE II, SOFA a GCS.

Výsledky: Ve studii byla prokázána kompartmentalizace produkce zánětlivých mediátorů do CNS. V likvoru z diagnostické LP korelovala koncentrace kortisolu s tíží průběhu BM ($r=0,596$; $p<0,01$). Negativní korelace byla zaznamenána mezi koncentrací glukózy a IL-10 v likvoru ($r=-0,679$; $p<0,01$). Zajímavé je, že koncentrace IL-10 v likvoru pozitivně korelovala rovněž s koncentrací proteinu ($r=0,604$; $p<0,01$), počtem neutrofilů ($r=0,98$; $p=0,049$) i hladinami IL-1beta ($r=0,50$; $p<0,05$), IL-6 ($r=0,693$; $p<0,01$) a TNF-alpha ($r=0,611$; $p<0,01$). V kontrolní LP byl prokázán významný pokles všech zánětlivých mediátorů.

Závěr: Průběh BM je asociován s vysokou koncentrací pro- i protizánětlivých mediátorů v likvoru. Výsledky studie dále naznačují možné využití stanovení dynamiky hladin TNF-alpha, IL-6, IL-8 a kortisolu v likvoru jako vhodných markerů regrese BM.

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

THE CHARACTERIZATION OF PTHE CHARACTERIZATION OF PLATELET MEMBRANE BOUND CELLULAR PRION PROTEIN

Author: Ing. Adéla Broučková
Advisor: Dr. Ing. Karel Holada, Institute of Microbiology and Immunology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

The conversion of cellular prion protein (PrP_C) into pathological one (PrP_{Sc}) is central event in transmissible spongiform encephalopathies. Various cells including blood elements express PrP_C, consequently it could be involved in transmission of prion diseases by blood. The characteristics of PrP_C in cells is essential to know in order to understand the mechanism of transmission and also the physiological function of PrP_C.

The expression of PrP_C on blood platelets has been described by previous study and the existence of intracellular PrP_C was proposed (Holada et al., 1998). The current study is aimed on characterization of binding of PrP_C on platelet membrane and the presence of PrP_C in lipid rafts. The platelet membrane and organelles were divided by bursts of sonication and subsequent centrifugation. Both fractions were treated with proteinase K (PK) to compare their sensitivity. In order to confirm the glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchoring of PrP_C, the membrane fraction was treated with aqueous hydrofluoric acid. The clustering of PrP_C in lipid rafts was followed by solubilization in cold Igepal CA-360, optionally with Triton X-100, and assayed by flotation on sucrose gradient. The proteins were analyzed by western blotting. The membrane bound PrP_C, whose GPI-anchoring was confirmed by HF treatment, was less sensitive to PK treatment than that in organelles. The PrP_C was found in lipid rafts, however, the association was not abolished by methyl-β-cyclodextrin treatment.

CYTOCHROME P450 2D6 POLYMORPHISMS IN THE CZECH POPULATION

Authors: Mgr. Helena Buzková, Kristina Pechandová, Ondřej Slanař
Advisor: Prof. MUDr. František Perlík, DrSc., Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Background: CYP2D6, a member of cytochrome P450 enzymes, metabolised over 25% of known and commonly used drugs. Genetic polymorphisms can cause, upon administration of drug in normal therapeutic dose, abnormal effect on the efficacy of a drug and its adverse drug reaction.

Aim: The aim of this study was to investigate the frequency of functionally important variant alleles of CYP2D6 gene through the Czech population.

Methods: DNA of 223 unrelated, healthy volunteers were analysed to detect the presence of CYP2D6*6, *5, *4, *3, and gene duplication. Presence of CYP2D6*5 and gene duplication was analysed by long range PCR, for other alleles PCR-RFLP was applied.

Results: The variant allelic frequencies in our population were 0,22%, 3,14%, 22,87%, 1,12% and 3,14% for CYP2D6*6, CYP2D6*5, CYP2D6*4, CYP2D6*3, and CYP2D6*MxN, respectively. Fifteen subjects carried two variant alleles leading to

predicted poor type of metabolism, 84 subjects were heterozygous extensive metabolizers. The distribution of variant alleles complies to the Hardy-Weinberg equilibrium.

Conclusions: The frequencies of functional variant alleles of CYP2D6 in Czech population are in concordance with the other Caucasians population. The full-text contains more detailed comparison via European white population.

Supported by grant 406/405 2005 (UK Praha)

METODICKÉ MOŽNOSTI DETEKCE BUNĚK NESPECIFICKÉ IMUNITY V TRANSPLANTÁTU ROHOVKY U MYŠI A EFEKT IMUNOSUPRESIV NA JEJICH KINETIKU

Autor: Mgr. Petra Bysterská

Školitelé: Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN, MUDr. Petra Svozílková, Ph.D., Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN, Oční klinika VFN a 1. LF UK

Cíl: Práce je zaměřena na metody detekce buněk nespecifické imunity, sledování změn jejich kinetiky v období po transplantaci a vliv imunosupresiv na oddálení rejekce. Cílem je přispět k objasnění imunologických mechanismů vedoucích ke vzniku rejekce a tolerance.

Metody: Alogenní ortotopická transplantace rohovky byla provedena na myším modelu (dárce C57BL/10; H-2^b, příjemce BALB/c; H-2^d). Opacita rohovky, jako hlavní marker rejekce, byla sledována obden pod operačním mikroskopem. Buňky byly detekovány pomocí imunohistochemického barvení kryorezů i celých explantovaných rohovek. Zastoupení jednotlivých buněčných populací (makrofágy, neutrofilů, iNOS pozitivní buňky) bylo hodnoceno za použití fluorescenčního nebo konfokálního mikroskopu. FK506 (tacrolimus; 0,2 mg/kg) a aminoguanidin (AG; 0,1 g/kg) byly aplikovány intraperitoneálně po dobu 4 týdnů.

Výsledky: V časném období po transplantaci převažovalo v rohovce zastoupení neutrofilů, v období rejekce byla rohovka masivně infiltrována makrofágy. iNOS pozitivní buňky byly přítomny pouze v období rejekce. FK506 a AG vedly k oddálení rejekce, statisticky významný byl efekt FK 506. FK506 blokoval v rejekovaných transplantátech tvorbu proteinu iNOS, zatímco AG jeho expresi neovlivnil.

Závěr: Naše výsledky dokazují, že makrofágy jsou ve velké míře zastoupeny v alogenních transplantátech rohovky a v době rejekce převažují nad ostatními buněčnými populacemi. V časném období po transplantaci pravděpodobně fungují jako buňky prezentující antigen. V době rejekce, kdy makrofágy produkují oxid dusnatý, mohou fungovat jako buňky efektorové. FK506 blokuje transkripci iNOS a vede k oddálení rejekce alogenního transplantátu rohovky. AG expresi proteinu iNOS neovlivňuje, je známo že blokuje aktivitu již vytvořeného enzymu.

*Podpořeno GA ČR 305/03/D130, IGA MZ NI 7531-3 a VZ MSM 21620807
Poděkování Prof. MUDr. J. Martínkovi, DrSc. a prof. RNDr. I. Raškovi, DrSc.*

INHIBICE RŮSTU VIRU VAKCINIE KYSELINOU ETHAKRYNOVOU

Autor: Ing. Zdeněk Čížek

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

VV byl v minulosti využíván k úspěšnému očkování proti černým neštovicím, způsobeným příbuznou variolou. Celosvětově se jím přestalo očkovat nejpozději roku 1980. V současnosti se v souvislosti s možným zneužitím varioly při bioterorismu začíná s očkováním vybraných skupin populace znovu, nicméně s rizikem poměrně vážných postvakcinačních komplikací. Z těchto důvodů je třeba hledat nové látky účinné proti poxviróvé infekci.

V naší laboratoři jsme pozorovali inhibiční efekty kyseliny ethakrynové (EA) na růst VV v buněčné linii HeLa G. EA je známé klíčkové diuretikum, intracelulárně působí jako redox modulující agens, neboť inhibicí glutathion-S-transferasy snižuje hladinu redukováného glutathionu (GSH). Z našich výsledků vyplývá, že zvyšující se koncentrace EA inhibuje růst viru vakcinie, charakterizovaný titrací. Možným mechanismem působení EA je inhibice virové morfogeneze, protože při koncentraci EA vyšší než 10 μM sice nevznikají infekční virové částice, ale exprese virových proteinů je inhibována pouze částečně. Pro morfogenesi (maturaci) VV jsou nepostradatelné pozdní virové SH-proteiny, jejichž funkce může být inhibována SH-modifikujícími látkami, např. EA.

Nespecifické účinky EA na metabolismus kontrolních či infikovaných buněk byly testovány pomocí charakterizace mitochondriálního membránového potenciálu, produkce kyslíkových radikálů a pomocí markerů apoptózy, přičemž koncentrace inhibující růst VV, tj. 10 μM, nejeví cytotoxické efekty v neinfikovaných buňkách.

In vitro zjištěná inhibiční koncentrace EA 10 μM by měla být dosažitelná i in vivo, přičemž nežádoucí účinky v podobě zvýšené diurézy by měly být krátkodobě zvládnutelné. Navrhujeme proto, že EA by jako látka běžně používaná v humánní medicíně mohla být vhodným kandidátem pro léčbu akutní poxviróvé infekce.



SROVNÁNÍ DIAGNOSTICKÝCH METOD, VYUŽÍVAJÍCÍCH TEPOVOU FREKVENCI JAKO PROSTŘEDEK URČOVÁNÍ VHODNÉ INTENZITY ZATÍŽENÍ POHYBOVÉ AKTIVITY, PŘI LÉČBĚ PACIENTŮ S METABOLICKÝM SYNDROMEM

Autor: Mgr. Petr Fábín

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

Zařazení optimální pohybové aktivity jako součást léčby pro pacienta s metabolickým syndromem se jeví jako velmi významný prvek při hodnocení výsledků studií dané problematiky. Předpokladem pozitivních změn sledovaných parametrů přímo souvisejících s léčbou pacientů s metabolickým syndromem, je správné stanovení intenzity pohybové aktivity pro jednotlivé pacienty. Výběr vhodné metodiky při preskripci intenzity zatížení pro skupinu pacientů s metabolickým syndromem je klíčový.

Úvod: Mluvíme-li o preskripci a kontrole vhodné intenzity zatížení je v praxi nejčastěji využíván systém sledování tepové frekvence (TF). Vybrali jsme čtyři diagnostické metody, kterými bylo provedeno stanovení optimální TF pro aerobní pohybovou aktivitu konkrétních pacientů.

Metodika: U desetičlenné skupiny pacientů s diagnózou metabolického syndromu, jsme provedli optimální TF čtyřmi vybranými způsoby (1, *spiroergometrie*, 2, *CHR test*, 3, *FIT TEST Polar S 810*, 4, *výpočet na základě vzorců a dosazovaných tabulkových hodnot*). Získané výsledky jsme porovnali. Dále jsme hodnotili schopnost pacientů dodržet určené zatížení prostřednictvím subjektivního hodnocení Borgovou škálou vnímaného úsilí.

Výsledky: Celkové hodnocení poukazuje na vliv aktuálního zdravotního stavu pacienta, který se jeví jako zásadní při výběru metodiky stanovení optimální TF. Pro danou skupinu deseti pacientů nebyla žádná z metod vyhodnocena jako nevhodná. Při větším počtu probandů rozdělených do homogenních skupin např. (BMI, věk, zdatnost apod.) je možno očekávat výsledky, které potvrdí vhodnost jednotlivých metodik v závislosti na homogenitě skupiny.

Závěr: Dílčí výsledky porovnání jednotlivých metod stanovujících optimální TF při pohybové aktivitě pro pacienty s metabolickým syndromem jsou výrazným podnětem pro rozsáhlejší studii např. v rámci výzkumného grantu, kde by bylo možno hypotézy statisticky potvrdit.

OVLIVNĚNÍ POOPERAČNÍ MOTILITY GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU, SROVNÁVACÍ STUDIE S ITOPRIDEM HYDROCHLORIDEM.

Autor: MUDr. Roman Fraško

Školitel: Doc. MUDr. Robert Gürlich, CSc., Chirurgická klinika IKEM

Úvod: Pooperační gastroparesa je fyziologickou reakcí organismu na operační zásah a významně ovlivňuje způsob rekonvalescence nemocného a také jeho subjektivně vnímaný komfort v bezprostředním pooperačním období. Cílem studie bylo prozkoumat, zda lze za pomoci perkutánní elektrogastrografie, metody umožňující monitoraci myoelektrické aktivity zažívacího traktu, zjistit rozdíly v časnosti nástupu fyziologické aktivity gastrointestinálního traktu mezi skupinami operantů, kteří v perioperačním období užívali prokinetika a kteří nikoliv.

Metodika: Na I. chirurgické klinice 1. LF a VFN jsme zkoumali dvě skupiny nemocných podstupujících laparoskopický výkon. Jednalo se o pacienty operované elektivně pro cholecystolithiasu a dále pak o nemocné podstupující laparoskopickou bandáž žaludku pro morbidní obezitu. Obě tyto skupiny byly dále rozděleny do dvou podskupin v závislosti na užívání prokinetika Ganaton (Itoprid hydrochlorid). Záznam perkutánním elektrogastrografem byl pořizován v den před operací, dále v den operace, asi 2–3 hodiny po ní a další dva pooperační dny.

Výsledky: Uvedeným způsobem bylo vyšetřeno celkem 45 nemocných (laparoskopická cholecystectomie 25, laparoskopická bandáž žaludku 20) U nemocných podstupujících oba operační výkony jsme v den operace a první pooperační den zjistili signifikantně větší počet pacientů s normogastrii. Nejčastějším patologickým nálezem byla bradygastrie.

Závěr: Podávání prokinetika v perioperačním období má pozitivní vliv na návrat fyziologické aktivity zažívacího traktu, který byl objektivizovaný záznamem pořízeným perkutánním elektrogastrografem.

EXPRESSION OF CELLULAR PRION PROTEIN ON BLOOD CELLS

Author: Mgr. Hana Glierová

Advisor: Dr. Ing. Karel Holada, Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

The pathogenesis of transmissible encephalopathies is associated with the conversion of cellular prion protein (PrP^c) into a protease-resistant PrP^{sc}. PrP^c is found on many cell types including blood elements. Explanation of PrP^c function and its localization within blood elements is necessary for understanding the disease process and for development of methods for detection of prions in blood. It is known, that PrP^c contains five Cu²⁺-binding octapeptide repeats. Cycling of PrP^c has been described in cultured cells in presence of Cu²⁺. The binding of Cu²⁺ may also play role in the conformation of PrP^c. We studied cycling of platelet PrP^c in presence of Cu²⁺ and its sensitivity to proteolysis by proteinase K. Platelets were incubated in the presence of Cu²⁺ or EDTA and after digestion with protease K analysed by flow cytometry using monoclonal antibodies 1562 and 6H4. We did not observe neither cycling of PrP^c nor any significant difference in sensitivity of PrP^c in the presence of copper ions or EDTA in comparison with standard conditions. In the next study we

aimed at intracellular localization of PrPc within platelets. Platelet organelles were separated on density gradient by ultracentrifugation. Western blotting analysis revealed that the majority of PrPc was localized in fractions rich in α -granular markers (P-selectin and fibrinogen). Our results suggest that PrPc is a platelet α -granular protein and that platelet PrPc in contrast to neuroblastoma cells is not internalized upon binding of Cu^{2+} ions.

PREVALENCE KOUŘENÍ V TĚHOTENSTVÍ, JEHO DŮSLEDKY A ÚROVEŇ INTERVENCE

Autoři: MUDr. Veronika Himmerová, Eva Králíková

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

Úvod: Kouření během těhotenství může mít závažné důsledky jak pro dítě tak pro matku. V České republice kouří okolo 25% žen starších 15 let. Mezi dívkami ve věku 15–18 let je okolo 50 % kuřáček. Těhotné kuřáčky by měly být zvláštním cílem pro intervenci, která není v současné době u nás dostatečná.

Cíle: zjistit prevalenci kouření u kuřáček, jejich kuřácké návyky a faktory spojené s kouřením a dále zmapovat úroveň poskytnuté intervence.

Metody: V těhotenské poradně před porodem byl proveden rozhovor se 187 zdravými těhotnými ženami. Byly dotázány na kouření, úroveň vzdělání, sociální podmínky a intervenci poskytnutou jejich gynekologem. K verifikaci odpovědí týkajících se kouření byl použit Bedford Smokerlyzer k měření hodnoty CO ve vydechaném vzduchu. Doplnující data byla po porodu získána z nemocničních záznamů. Po porodu byly porovnána porodní váha a zralost novorozence u kuřáček a nekuřáček.

Výsledky: Prevalence kouření během těhotenství byla 11,3 %. (Během těhotenství 76 % kuřáček redukovalo počet vykouřených cigaret za den). Kouření bylo výrazně spojeno s úrovní vzdělání: ani jedna kuřáčka neměla vysokoškolské vzdělání, 71,5 % kuřáček nemělo ani maturitu, pro porovnání jen 11 % nekuřáček nemělo maturitu. Kuřáčky jsou častěji samoživitelky (14,3 % vs 1,3 % u nekuřáček) a nezaměstnané (24 % vs 2,7 %). Průměrná délka těhotenství u kuřáček byla 275,5 dnů, u nekuřáček 279,5 dnů. Průměrná porodní váha novorozence u kuřáček byla 3082 g, u nekuřáček 3437 g (rozdíl 355 g). Mírná nezralost byla pozorována u 15 % dětí kuřáček a u 1,4 % dětí nekuřáček.

Závěr: Tato studie naznačuje, že kuřáčky mají kratší těhotenství, jejich děti mají nižší porodní váhu a větší pravděpodobnost mírné nezralosti než děti nekuřáček. Kuřáčky jsou spíše ženy s nízkým nebo žádným vzděláním, častěji nezaměstnané a samoživitelky s nedostatečnou podporou rodiny. Intervence a poskytování pomoci těmto ženám ze strany jejich gynekologa je prakticky nulová.

TECHNICKÁ ÚSKALÍ PRO CHIRURGA PŘI PEROPERAČNÍ IDENTIFIKACI SENTINELOVÉ UZLINY U NĚKTERÝCH MALIGNIT ZAŽÍVACÍHO TRAKTU (PŘÍPADOVÁ STUDIE)

Autor: MUDr. Dato Jatchvliani – postgraduální student 1. lékařské fakulty UK v Praze v oboru „Experimentální chirurgie“ a sekundární lékař I. chirurgické kliniky – břišní, hrudní a úrazová chirurgie 1. LF UK a VFN

Školitel: Doc. MUDr. Jan Šváb, CSc., přednosta I. chirurgické kliniky – břišní, hrudní a úrazová chirurgie 1. LF UK a VFN – hlavní školitel

Stanovení sentinelové („strážní“) uzliny (s. u.), čímž se míní první lymfatická uzlina (l. u.) drénující primární nádor, se stala od sedmdesátých let minulého století relativně málo invazivní metodou průkazu metastatického šíření nádoru (grading). Má význam i u tumorů GIT, kde naději na dlouhodobé přežívání dává nemocným jen radikální chirurgický výkon se současným odstraněním co největšího množství regionálních spádových l. u. V studii jsou shrnuty předběžné výsledky výzkumu na I. chirurgické klinice 1. LF a VFN, kde je propracováván tento diagnostický postup, rozšířený i o detailní patomorfologický a imunologický průkaz vztahu mezi pomocí barevného indikátoru v chirurgickém poli přímo zjištěnou lymfatickou drenáží a skutečným metastatickým postižením takto označených a pak chirurgicky odstraněných uzlin. Na základě tří pacientů, kde došlo k peroperačnímu určení s. u., jsou zpřesněny podmínky techniky u karcinomu žaludku, tračnicku a rekta (tj. místo aplikace barviva, jeho množství, jakož i technika injekce) zvláště s cílem předejít modrému zabarvení operačního pole, což může znepříjemnit chirurgovi práci. Na základě předchozích orientačních peroperačních aplikací a také v souladu s literárními údaji autor může potvrdit, že úspěšnost průkazu s. u. závisí na lokalizaci nádoru a na výskytu aberantní lymfatické drenáže s případným výskytem spádové uzliny i mimo předpokládanou oblast, včetně možnosti existence skip-metastázy. Pozornost je věnována i značení s. u. na peroperačně odebraném histologickém materiálu k snadnější identifikaci pro patologa jakož i délce transportní doby při následném zpracování v morfologické nebo imunologické laboratoři. Jako při každém chirurgickém zákroku, i při tomto vyšetření s aplikací barviva v křehkém operačním poli, jsou kladeny i při zjišťování s. u. nároky nejen na chirurgovu zručnost, jež se výrazně projeví na úspěšné identifikaci této první nádor drénující uzliny, ale i na jeho snaze přesně provést rozsahem minimální zákrok. Dosáhnout přesnou techniku stanovení s. u. je nezbytným východiskem pro další výzkum této onkochirurgické problematiky.

**MOTORICKÉ A KOGNITIVNÍ DEFICITY U HUNTINGTONOVY NEMOCI****Autoři:** MUDr. Jiří Klempíř, Nataša Špačková, Olga Nováková, Jan Roth, Neurologická klinika 1. LF UK a VFN**Školitel:** Doc. MUDr. Jan Roth, CSc., Neurologická klinika 1. LF UK a VFN

Cíl studie: Analyzovali jsme motorické a kognitivní postižení u osob v počátečních až středně pokročilých stádiích Huntingtonovy nemoci (HN). Hledali jsme funkce, které jsou nejvíce postiženy u HN a jejich klinický význam.

Soubor a metodika: Vyšetřili 29 pacientů (11 mužů a 18 žen) s geneticky verifikovanou HN. Aktuální věk nemocných s HN byl 45 let, klinický počátek 43,1 a trvání HN 6,7 let, patologický počet CAG tripletů 45,3.

Pacienti byli testováni pomocí škály UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale), kvantifikující míru hybného postižení a baterii neuropsychologických testů.

Výsledky: Stupeň motorického postižení stanovený pomocí škály UHDRS motor assessment (UHDRS-M) koreluje s trváním HN ($r=0,431$, $p<0,031$). Hloubka deprese měřená Beck Depression Inventory (BDI-II) koreluje s UHDRS-M ($r=0,443$, $p<0,021$).

BDI-II také koreluje s výkonem v paměťovém testu učení (AVLT): volné vybavení ($r=-0,404$, $p<0,037$), interference ($r=-0,462$, $p<0,015$), rekognice ($r=-0,5$, $p<0,008$).

Motorický deficit koreluje s výkonem v kognitivních testech zaměřených na psychomotorické tempo a exekutivní funkce: Symbol Digit Modalities Test ($r=-0,716$, $p<0,00001$), Trail Making Test část A ($r=0,606$, $p<0,0004$) a část B ($r=0,498$, $p<0,007$), Verbal Fluency Test ($r=-0,499$, $p<0,005$) a Stroop Test (část T ($r=0,551$, $p<0,004$), část S ($r=0,484$, $p<0,014$), část B ($r=0,454$, $p<0,022$).

Motorický deficit však koreluje i s kognitivními testy jejichž výkon není výrazně ovlivněn psychomotorickým tempem a motorickým postižením: Mini Mental State Examination ($r=-0,585$, $p<0,0007$), Clock Test ($r=-0,429$, $p<0,018$), AVLT volné vybavení ($r=-0,407$, $p<0,023$), Mattis Dementia Rating Scale ($r=-0,473$, $p<0,0095$).

Závěr: Mezi nejvíce postižené kognitivní funkce u HN patří: pozornost, učení, paměť, psychomotorické tempo a exekutivní funkce. Prohlubující se dysexekutivní syndrom negativně ovlivňuje nejen kognitivní výkon, ale také motorický výkon. Depresivní syndrom zhoršuje motorický výkon a paměť.

*Podpořeno grantem IGA MZ ČR 7623-3***STAV FYZICKÉ KONDICE U OBÉZNÍCH PACIENTŮ S DM2 I PACIENTŮ S PROSTOU OBEZITOU****Autoři:** MUDr. Robert Kučera, MUDr. Zdeněk Lačňák**Školitel:** Doc. MUDr. Brandejský, CSc., Ústav tělovýchovného lékařství I. LF UK a VFN

Obezita patří k nejčastějším onemocněním nejen v České republice. S nadváhou a obezitou je spojena řada mechanických a metabolických komplikací. Víme, že účinná léčba obezity se neobejde bez úpravy životního stylu resp. změny stravovacích návyků v kombinaci se zvýšením energetického výdeje, tedy pohybovou aktivitou. Mnoho obézních má po opakovaných redukčních pokusech organismus zadaptovaný na nízký příjem, a proto vhodná a pravidelná fyzická aktivita je prakticky jedinou fyziologickou metodou vedoucí prokazatelně k dlouhodobému poklesu hmotnosti. Pro udržení pacientovi motivace redukovat je důležitá preskripce vhodné tj. vzhledem k přidruženým onemocněním bezpečně ale přesto účinné pohybové aktivity.

Cílem studie bylo stanovit fyzickou kondici u obézních pacientů a obézních pacientů s diabetem a tyto dvě skupiny porovnat.

Metody: Pacienti byly vyšetřeni spiroergometrií provedenou podle metodiky IBP z roku 1976 (Seliger) s hodnocením subjektivního vnímání zátěže dle Borga.

Výsledky: Celkově bylo vyšetřeno 75 pacientů ve věku od 23 do 70 let. Z toho 35 byly pacienti obézní s DM2 a 40 pacientů s prostou obezitou. U pacientů s prostou obezitou fyzická zdatnost dosahovala téměř 80% ve srovnání s normou stejného věku a pohlaví, zatímco pacienti obézní s DM2 dosáhli průměrné zdatnosti 71 % ve srovnání s normou stejného věku a pohlaví.

Závěr: Porovnali jsme fyzickou zdatnost pacientů s prostou obezitou a pacientů obézních s DM2. Pacienti s prostou obezitou jsou celkově více fyzicky zdatná než druhá zkoumaná skupina.

VZTAH OXIDU DUSNATÉHO K β_3 -ADRENERGNÍ LIPOLÝZE A KASKÁDĚ CYKlickÉHO AMP**Autor:** MUDr. Nikolina Kutinová-Canová**Školitel:** Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN

Úvod: Modifikace funkcí β_3 -adrenergních receptorů (AR) v bílé tukové tkáni může vést následkem snížené lipolýzy k poruše metabolismu lipidů. Ačkoliv byla v adipocytech detekována jak endoteliální tak inducibilní syntáza oxidu dusnatého (NOS), úloha NO v tukové tkáni není stále objasněna.

Cílem naší práce proto bylo studovat možný vztah mezi produkcí NO a transdukční cestou β -AR-cAMP spouštějící lipolýzu.

Metodika: Adipocyty byly izolovány z epididymální tukové tkáně potkanů a poté kultivovány 1) s induktory a inhibitory lipolýzy: neselektivní (isoprenalin)/selektivní (BRL37344) β_3 -agonista, neselektivní (propranolol)/selektivní (bupranolol) β_3 -antagonista, analog cAMP (db-cAMP), forskolin jako aktivátor adenylcyklázy (AC), inhibitor fosfodiesterázy (3-isobutyl-1-metyl-xantin, IBMX) a inhibitor AC (SQ22,536); 2) s látkami zasahujícími do signálního systému NO: nespecifický (N^w-nitro-L-arginin-metylester, L-NAME)/specifický (aminoguanidin, AG) iNOS inhibitor, NO-donor (S-nitroso-N-acetyl-penicillamin, SNAP) a analog cGMP (8-Br-cGMP). Produkce NO a lipolýza byly kvantifikovány stanovením hladin nitritů, glycerolu a volných mastných kyselin (VMK) ve vzorcích média.

Výsledky: Isoprenalin, BRL, db-cAMP, forskolin a IBMX významně zvýšily hladiny jak nitritů, tak i glycerolu a VMK. Naopak propranolol, bupranolol a SQ významně snížily β -agonisty indukovanou produkci NO a lipolýzu. Navíc byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinami nitritů a glycerolu, resp. VMK. L-NAME i AG významně potlačily lipolytické působení BRL. SNAP zvýšil uvolňování glycerolu a VMK z nestimulovaných adipocytů, ale 8-Br-cGMP neměl žádný vliv na lipolýzu.

Závěr: Uvedené údaje naznačují, že stimulace β -AR, převážně pak β_3 -AR, aktivující cAMP kaskádu vede nejenom k lipolýze adipocytů, ale současně indukuje produkci NO, který zřejmě svým působením na některou ze složek této transdukční cesty potencuje výsledný lipolytický efekt a jako signální molekula s mnohočetnými účinky tak hraje důležitou úlohu v metabolismu lipidů bílé tukové tkáně.

Podpořeno IGA MZ NL 7418/3 a J13/98:111100002

VLIV ŽLUČOVÝCH KYSELIN A OXIDU DUSNATÉHO NA APOPTÓZU JATERNÍCH BUNĚK

Autor: MUDr. Nikolína Kutinová-Canová

Školitel: Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN

Úvod: Retence a akumulace hydrofóbních žlučových kyselin (ŽK) může způsobit doposud nejasným způsobem jaterní toxicitu indukci apoptózy. Bylo prokázáno, že hydrofóbní ŽK mohou v izolovaných hepatocytech (HC) a mitochondriích indukovat produkci oxidu dusnatého (NO), který je některými autory řazen mezi mediátory apoptózy. Cílem prezentované práce bylo objasnit vliv ŽK na apoptózu a produkci NO buňkami jaterní tkáně *in vitro*.

Metodika: Precizně nakrájené plátky jaterní tkáně (PCLS) byly připraveny pomocí „Brendel Vitron Tissue Slicer“ z lidských a vepřových jater a poté kultivovány v kompletním RPMI médiu bez nebo s hydrofóbními ŽK, deoxycholovou (DCA) a glykodeoxycholovou (GDCA), a nebo s hydrofilní ursodeoxycholovou kyselinou (UDCA), v dávce 0,5 až 2 mM po dobu 3, 12 a 24 hodin. Na konci pokusu byly stanoveny hladiny laktátdehydrogenázy (LDH) a nitritů v médiu. Vzorky fixované jaterní tkáně byly použity k imunohistochemickému barvení markerů: apoptózy – kaspázami štěpeného cytokeratinu 18; proliferace – Ki-67; exprese inducibilní syntázy NO (iNOS).

Výsledky: ŽK, výrazněji pak hydrofóbní, v závislosti na dávce a délce inkubace významně zvyšovaly hladiny nitritů a LDH v médiu. Všechny ŽK indukovaly expresi iNOS v HC lidských a v Kupfferových buňkách (KC) obou druhů. Stupeň apoptózy, který byl rozsáhlejší v prasečích PCLS, se po stimulaci s UDCA nelišil od kontroly a narůstal s časem. DCA a GDCA dokonce mírně snižovaly počet apoptotických buněk v průběhu celé studie. Ve všech skupinách bylo více Ki-67 pozitivních KC než HC a proliferační potenciál výrazně klesal s časem.

Závěr: Využití PCLS odhalilo druhově specifické rozdíly v citlivosti jednotlivých jaterních buněk k apoptotickým stimulům indukovaných ŽK. HC exponované nízkým dávkám hydrofóbním ŽK velice rychle vyvinuly rezistenci k apoptóze. Tato rezistence by mohla být způsobena zvýšenou expresí iNOS a produkci NO, což řadí NO mezi další důležité signální molekuly, které regulují proces apoptózy za patologických podmínek provázaných cholestázou.

Podpořeno programem Socrates-Erasmus při stáži na LF v Kolíně n. Rýnem

TĚLESNÉ SLOŽENÍ U PACIENTŮ S METABOLICKÝM SYNDROMEM VE SROVNÁNÍ SE ZDRAVÝMI OSOBAMI

Autoři: MUDr. Zdeněk Lačňák, MUDr. Robert Kučera, Mgr. Petr Fábín

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

Úvod: Obezita a metabolický syndrom X (MSX) patří mezi civilizační onemocnění, jejichž prevalence v civilizovaných zemích nebezpečně stoupá. Stanovení somatotypu a měření procenta tělesného tuku je mnohem spolehlivější způsob stanovení stupně tělesné nadváhy než obvykle prováděné měření hmotnostně-výškového indexu (BMI), měření poměru pas/boky (WHR) nebo dokonce od pouhé měření tzv. Brocova indexu. Jednotlivé morfologické znaky mající vztah ke tvaru a složení těla jsou u somatotypu vyjádřeny číselnými hodnotami. Podle somatotypu je také možno posoudit, jaké má jedinec pohybové dispoziční.

Cíl: Cílem naší práce bylo porovnat somatotypy u pacientů s MSX a u zdravých osob. Vzhledem k tomu, že pacienti s metabolickým syndromem budou absolvovat dlouhodobý pohybový režim v Rekondičním centru při 1. LF UK, chceme znát výchozí stav tělesného složení těchto pacientů a stav, jakého by pacienti měli dosáhnout na konci cíleného pohybového režimu.



Metodika: V roce 2003 jsme na našem pracovišti vyvinuli softwarovou aplikaci k usnadnění a urychlení antropometrického vyšetření somatotypu (z 11 naměřených antropo-metrických dat) podle metodiky Heathové a Cartera. Uvedenou aplikaci jsme použili ke stanovení tělesného typu u několika desítek pacientů s MSX a zdravých osob. **Výsledky:** Výchozí somatotypy pacientů s MSX před zahájením rekondičního pohybového režimu byly vysoce signifikantně méně příznivé než u zdravých osob. Třebaže morfologicko-funkční dispozice jsou do značné míry geneticky determinovány (cca ze 60–70 %), ovlivnitelnou složku somatotypu se pokusíme pohybovou terapií zlepšit tak, aby se přiblížila tzv. střednímu somatotypu.

VYUŽITÍ PSYCHOMETRIE V HODNOCENÍ RIZIKA ZUBNÍHO KAZU PŘEDŠKOLNÍCH DĚTÍ

Autor: MUDr. Erika Lenčová

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

Prezentace podává přehled o možnostech využití psychometrie v hodnocení postojů rodičů k ústnímu zdraví jejich předškolních dětí. Tímto způsobem se psychometrie může uplatnit v hodnocení rizika zubního kazu a dalších onemocnění ústní dutiny zejména u sledovaných skupin obyvatelstva. Psychometrie vychází ze vztahu postojů a behaviorálních schémat. Z tohoto důvodu nalézá uplatnění i v dalších programech zaměřených na podporu zdraví i na národní úrovni. V terénní epidemiologické praxi se měření postojů provádí nejčastěji pomocí dotazníků obsahujících psychologické škály. Spolehlivost a validitu zvoleného typu škály je nutné ověřit v pilotní studii. Data získaná dotazníky jsou zpracována pomocí statistických technik, které v odpovědích respondentů hledají hypotetické, latentní proměnné (společné faktory). Nejčastěji využívané statistické techniky jsou odvozené od faktorové analýzy (analýza komponent a analýza společných faktorů) a logistické regrese. Ve sféře veřejného zdravotnictví je měření postojů využíváno v omezené míře, data získaná touto metodou však mohou být využita v rámci zdravotnických programů zaměřených na podporu zdraví populace. Popisovaná metodika byla použita při zpracování dotazníkových dat získaných v rámci studie „Behaviorální faktory ovlivňující orální zdraví předškolních dětí“ (doktorandské studium autorky v oboru preventivní medicíny, 2004–2005).

Klíčová slova: měření postojů, orální zdraví, předškolních dětí, faktorová analýza.

NEJČASTĚJŠÍ KONTAKTNÍ ALERGENY V ČESKÉ POPULACI

Autor: MUDr. Alena Machovcová

Školitel: Doc. MUDr. Daniela Pelclová, CSc., Klinika nemocí z povolání 1. LF UK a VFN

Alergická kontaktní dermatitida se vyskytuje asi ve 4–7 % všech kožních onemocnění. Standardní vyšetřovací technikou pro zjištění kontaktní alergie na určité látky zevního prostředí jsou epikutánní testy. Technika vyšetření umožní identifikovat příčinný alergen a pacient se v dalším životě musí vyvarovat kontaktu s tímto alergenem. Standardní evropská sada alergenů je schopna zachytit 70–80 % všech kontaktní alergií.

Ve shodě se zahraničními studii jsou naše zjištění obdobná. Nejčastějšími kontaktními alergeny v české populaci jsou soli kovů, zejména soli niklu (13,8–15,3 %). Soly ostatních kovů (chrom 3,2–4,4 %, kobalt 5,2–5,5 %) jsou dalšími významnými kontaktními alergeny. Na předních místech kontaktních alergenů jsou dále peruánský balzám (7,3–8,4 %), směs parfémů (5,8–13,4 %), formaldehyd (2,9–4,2 %).

Testování proběhlo v několika obdobích (1994, 1997–2001, 2003) na celém území České republiky. Soubor zahrnoval přes 15 tisíc pacientů.

EXPRESSION OF PRION PROTEIN IN MOUSE ERYTHROLEUKEMIA CELLS

Author: Mgr. Martin Panigaj

Advisor: Dr. Karel Holada, Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Cellular prion protein is encoded by conserved PRNP gene.

Its hallmark is crucial involvement in pathogenesis of prion diseases. In spite of its importance, the physiological role of PrP^c remains unclear. Prion diseases have very long incubation period. In the effort to detect the disease before manifestation, the molecular markers are searched for.

To such potential marker belongs EDRF (Erythroid Differentiation Related Factor) which expression decreases with the progress of the disease. EDRF is expressed during hematopoiesis and its function is chaperon of α -globine subunits. Relation between PrP^c and EDRF is not known. Our project is aimed at the comparison of expression pattern of PrP^c and EDRF during erythropoiesis. For this purpose we use murine erythroleukemia cells (MELs) as a model system. MELs differentiate in the way of erythrocyte-like cells upon induction by chemical inducer (HMBA). Cells are harvested in selected time points. Differentiation is monitored by acidic benzidine staining. Then RNA is isolated and processed by reverse transcription to cDNA. cDNA is used for real-time PCR. We amplify selected genes: PRNP, EDRF, ACTIN and B-GLOBINE as gene control of hemoglobine synthesis. Level of expression is evaluated as relative ratio to ACTIN. Levels of proteins are evaluated for PrP^c, EDRF and c-Myb by Western blot. Treatment of MELs by HMBA leads to increased expression of PrP^c and EDRF. The ongoing project may help clarify the relation of PrP^c to EDRF expression and the mechanism of EDRF down-regulation during prion diseases.

CONSTRUCTION AND PURIFICATION OF MOUSE RECOMBINANT PRION PROTEIN

Author: Mgr. Alexandr Pavlíček

Advisor: Dr. Ing. Karel Holada, Institute of Immunology and Mikrobiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Prions are class of the infectious agents that cause a group of fatal prion diseases in which the cellular form of the prion protein (PrP(C)) is transformed into the disease-related scrapie variant (PrP(Sc)). PrP(Sc) is known to be responsible for the group of diseases call transmissible spongiform encephalopathies, neurodegenerative brain disorders.

The two PrP isoforms differ in their structure and resistance to degradation. The molecular mechanism by which the PrP(Sc) is formed and causes infectivity or neurodegeneration is not known.

Last year were reported first cases of the transmission of the PrP(Sc) by blood transfusion highlighting the need of understanding of PrP interaction with blood cells.

We used cDNA of the mouse PrP as a template for PCR. Than we designed the primers for amplification of the mature PrP. PCR has given sufficient amounts of amplified fragment. The gene coding mature PrP lacking signal peptides (aminoacides residues 23-231) was inserted into pMal (NEB) plasmid coding Maltosa binding protein (as a tag for affinity purification) and pHAT (BD Bioscience Clontech) plasmid coding His affinity tag. Both vectors were transformed into the strains *E. coli* XL-1 and *E. coli* BL-21.

Recombinant PrP was purified on immobilized metalaffinity chromatography. On SDS-PAGE gel stained with coomassie briat blue were visualised two bands. Band with lower molecular weigth (MW) around expected MW (25 kDa) and a band corresponding to double size of MW which corresponds to dimer.

POLYMORPHISMS OF THE MDR1 GENE IN THE CZECH POPULATION

Authors: Mgr. Kristina Pechandová, Helena Buzková, Ondřej Slanař,

Advisor: Prof. MUDr. František Perlík, DrSc., Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Background: There exists a marked interindividual variability of P-glycoprotein expression and activity, which can be of clinical importance due to the large number of drugs that are substrates for the transporter. Previously identified polymorphisms in MDR1 gene belong among the important causes of this phenomenon.

Aim: Our aim was to investigate the frequency of major functional SNPs of MDR1 gene coding for P-glycoprotein in the Czech population.

Methods: DNA was isolated from whole blood of 163 healthy, young and unrelated subjects (100 females and 61males, aged from 23 to 28 years). The genotypes of polymorphic positions C3435T, and G2677T/A were determined by PCR-RFLP.

Results: Observed allelic frequencies were 56,75%, 47,55%, and 0,61% for the alleles 3435T, 2677T, and 2677A, respectively. We have found 59 subjects homozygous for 3435T, and 40 for 2677 T alleles. The allelic distribution complies well with Hardy-Weinberg equilibrium.

Conclusion: Allelic frequencies of functionally important MDR1 variants is in the Czech population similar to that of other Caucasian populations.

UVOLNĚNÍ RTUTI Z ORGANIZMU PO PODÁNÍ DMPS U PACIENTŮ S AUTOIMUNITNÍM ONEMOCNĚNÍM

Autoři: Mgr. Štěpán Podzimek, Jarmila Procházková, Jiřina Bártová, Zdena Čábelková, Jana Nerudová, Vera Stejskal

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

Úvod: Uvolňování kovových iontů z dentálních materiálů může u vnímavých osob způsobit zdravotní problémy. Cílem práce bylo určit zda uvolňování rtuti při výměně amalgamových výplní může zhoršit zdravotní stav u pacientů s autoimunitní thyreoiditidou a s prokázanou intolerancí rtuti.

Metodika: U 42 pacientů s autoimunitní thyreoiditidou vybraných ze skupiny 107 pacientů s autoimunitním onemocněním byla provedena detailní anamnéza, zubní prohlídka a vyplněn dotazník. Možná senzitivita vůči anorganické rtuti a čtyřem formám organické rtuti byla zjišťována testem proliferace lymfocytů modifikovaným pro kovy – MELISA®. U pacientů s intolerancí rtuti byla provedena výměna amalgamových výplní za nekovové. Pro snížení zátěže organismu rtutí užívali pacienti před a po výměně amalgamových výplní chelační látku DMPS. Koncentrace rtuti v moči byla určena před a po této terapii. Kontrola zdravotního stavu a kontrolní test MELISA® byl proveden půl roku po výměně.

Výsledky: U pacientů s autoimunitní thyreoiditidou byly v moči před i po chelační terapii nalezeny signifikantně vyšší hladiny rtuti v porovnání se zdravou populací, ale mnohem nižší hladiny ve srovnání s osobami profesně exponovanými rtuti.



Po výměně amalgámů došlo ke zvýšení koncentrace rtuti v moči před i po terapii DMPS. Po výměně amalgámů se také zvýšila depozice rtuti v ledvinách před i po chelační terapii. Rozdíly však nebyly statisticky významné. U pacientů, kteří podstoupili výměnu amalgámů nebylo pozorováno významné zhoršení jejich zdravotního stavu. Po šesti měsících od výměny amalgámů většina pacientů pozorovala vylepšení jejich zdravotních potíží. Subjektivní zlepšení zdravotního stavu korelovalo se snížením reakce na rtuť sledovanou *in vitro* testem MELISA®.

Závěr: U pacientů s autoimunitní thyreoiditidou byly zjištěny vyšší hodnoty depozice rtuti v porovnání se zdravou populací. Výměna amalgámů nesignifikantně zvýšila hladiny rtuti v moči pacientů a ani nezpůsobila žádný výrazný nežádoucí účinek. To může být dáno protektivním účinkem DMPS a technikou ochrany pacienta před nežádoucí expozicí během odstraňování amalgámových výplní.

Potvrdili jsme přínosný efekt výměny amalgámů na zdravotní stav u pacientů s autoimunitní thyreoiditidou.

Tato studie je podpořena grantem IGA MZ ČR č. NK 7722-3

NIKOTIN BRÁNÍ DEGENERACI NEURONŮ HIPPOCAMPU VYVOLANÉ PODÁNÍM KYSELINY KAINÁTOVÉ

Autoři: MUDr. Vladimír Riljak, MUDr. Martina Milotová

Školitel: Prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc., Fyziologický ústav 1. LF UK

Systémové podání analogu glutamátu laboratornímu potkanovi, kyseliny kainátové, vede ke komplexu změn, charakterizovanému jak změnamí chování (behavoiální automatismy apod.) tak morfologickou alterací řady struktur CNS, především však hippocampu.

V odborném písemnictví je dokladováno, že nikotin by mohl mít některé neuroprotektivní účinky na CNS podaný i.p. v subconvulsivní dávce.

Cílem této práce bylo objasnit, zda hippocampus, nikotinem předlčených zvířat bude mít jiný histopatologický nále, než u zvířat, kterým bude podán pouze kainát.

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

První skupině byl podán nikotin i.p. v dávce 1 mg/1000 g živé váhy. Druhé skupině byl podán kainát 10 mg/1000 g živé váhy. Třetí skupině byl podán nikotin i.p. v dávce 1 mg/1000 g živé váhy a následně jim byl po 30 minutách podán kainát 10 mg/1000 g živé váhy (jedná se o konvulsivní dávku). Čtvrté skupině byl podán dle výše uvedených schémat fyziologický roztok.

Dva dny po aplikaci byla zvířata transkardiálně perfundována (neutrálním paraformaldehydem), jejich mozky obarveny (Fluoro-Jade B, Hoechst) a preparáty pozorovány mikroskopem Olympus AX 70. Stručný histopatologický obraz: u první skupiny (pouze nikotin) nebyly pozorovány prakticky žádné změny proti kontrolám. Druhá skupina (pouze kainát): degenerující oblast CA3 a CA1 (ta degeneruje poněkud později).

Třetí skupina (nikotin+kainát): kvalitativně pozorována výrazně menší alterace hippocampu oblast CA1 zcela intaktní. Kontrolní skupina: nepozorovány žádné morfologické změny.

Tyto předběžné výsledky (budou ještě doplněny, především o další věkové skupiny zvířat, podrobnější analýzu histologického obrazu CNS a o nále EEG), nás vedou k závěru, že i.p. podání nikotinu zabraňuje alteraci CNS vyvolané kyselinou kainátovou, stejně tak zabráni vzniku KA-syndromu. O jeho mechanismu je možno vést širokou diskusi (antioxidační vlastnosti nikotinu apod.).

LYTICKÁ INFEKCE VIREM VAKCINIE INDUKUJE AKTIVACI KASPÁZ

Autoři: Mgr. Martina Spišáková, Jana Lišková, Marie Kalbáčová

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

Virus vakcinie (VV) z čeledi poxvirů, působí ve většině infikovaných buněk lýzu, tedy nekrózu. Přesto jsme v buňkách při lytické infekci VV pozorovali aktivaci kaspáz, proces typický pro apoptotickou formu buněčné smrti.

Aktivaci kaspáz jsme nejprve pozorovali pomocí metod využívajících průtokovou cytometrii, a to ve dvou epiteliálních buněčných liniích (BSC 40, Hela G). Použité metody charakterizují aktivaci kaspáz na třech úrovních jejich kaskády. První metoda deteguje aktivované kaspázy vazbou značeného pankaspázového inhibitoru z-VAD-FMK do jejich katalytického místa. Druhá metoda určuje přímo aktivitu kaspáz pomocí štěpení fluorogenního substrátu Rhodaminu 110-bis-aspartátu. Třetí metoda deteguje štěpení cytokeratin 18, jeden z produktů proteolytické aktivity kaspáz pomocí monoklonální protilátky (M30). V porovnání s kontrolami byla v obou buněčných liniích při infekci VV všemi výše uvedenými metodami stanovena zvýšená kaspázová aktivita. K ověření specifity použitých metod jsme aktivitu kaspáz v těchto buňkách dále charakterizovali western blot analýzou proteolýzy poly(ADP-ribózo)polymerázy (PARP) a cytokeratinu 18, typických substrátů kaspáz. Potvrdili jsme snížení hladin cytokeratinu 18, avšak změny hladin PARP jsme nepozorovali. Přidání pankaspázového inhibitoru z-VAD-FMK neovlivnilo růst VV v epiteliálních buňkách, zatímco vedlo k jeho poklesu v makrofázích, ve kterých infekce VV indukuje apoptózu. Nicméně inhibiční efekty z-VAD-FMK na růst VV v makrofázích se zdají být podmíněny spíše nespecifickým působením na metabolismus hostitelské buňky. Uvedené výsledky je možné vysvětlit rozdílnou kinetikou aktivace kaspáz, stability buněčných proteinů a průběhu infekce VV. Je možné uvažovat i o působení jiných proteáz než kaspáz.

PARALLEL PHENTERMINE LEVELS IN BLOOD SERUM AND SALIVA COLLECTED BY SALIVETTE

Authors: Mgr. Miroslava Szkutová, V. Habrdová, M. Balíková, M. Matoulek, Š. Svačina
Advisor: Doc. Ing. Marie Balíková, CSc., Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN

For some years, oral fluid samples have been attracting the attention for detection of psychoactive substances in impaired drivers for their non-invasive collection under direct observation and for the expectation that saliva drug levels may reflect psychomotoric state of a driver more closely than in urine. We have used the opportunity to study the partition of phentermine, the structural isomer of methamphetamine, between blood and saliva in human patients under therapeutic treatment. Blood and saliva of patients on therapy with 15 mg phentermine p.o. daily were collected 2.5 hours after morning dose. For saliva collection, neutral and citric acid types of Sarstedt Salivette have been chewed for 3 min within 5 min interval. Phentermine in samples was assayed by GC-MS validated methods. The saliva sample volumes were sufficient but variable in the range 1–3 ml without significant differences in obtained volumes between two types of Salivette. The mean concentration ratio saliva/serum was 6.1 at the first saliva collection. After repeating the collection using Salivette with citric acid, the ratio saliva/serum dropped to 1.4. Even if the exact volume of oral fluid collected in the described way was beyond our control and varied with impact on concentration, this study has supported the idea that saliva can be convenient sample for detection of basic drugs reflecting serum concentration in parallel, with higher concentration than in serum. Therefore, oral fluids may allow broader detection window in time after the dose.

SURFACE MOLECULES – MARKERS FOR DISTINGUISHING TH1 FROM TH2 MEDIATED DISEASE AT LAST?

Author: Zdenka Vaňková
Advisor: MUDr. Helena Marečková, CSc., Department of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Background: T-helper cell responses to antigens are classified as either Th1 response (cell-mediated, producing esp. interferon gamma /IFN γ /) or Th2 response (antibody-mediated, producing interleukin 4 /IL4/). Recently new surface molecules considered as typical for Th1 (CXCR3 and CCR5) and Th2 (CRTH2 and CD30) cells have been revealed. The aim of this study was to assess the correlation of these surface molecules with intracellular cytokines production in a clinical study, and thus their possible use for the examination of Th1/Th2 imbalance in routine laboratory practice.

Patients and methods: We examined peripheral blood samples in 78 patients (48 with ANCA associated vasculitis, 30 with multiple sclerosis) and 20 healthy controls. Using flow cytometry, we studied the intracellular production of IFN γ , interleukin 2 /IL2/, IL4 and tumour necrosis factor alpha /TNF α / in CD3+ T cells and interleukins 10 and 12 /IL-10, IL-12/ in monocytes (as inducing cytokines for Th1/Th2 switch); we also measured the percentage of CCR5, CXCR3, CRTH2 and CD30 positive cells.

Results: There was a positive correlation between IFN γ and IL12 production ($p < 0.01$). The higher IFN γ production in CD3+ T cells also correlated with increased numbers of CCR5+ and CXCR+ cells ($p < 0.01$, $p = 0.02$ resp.) and the CCR5+ cells positively correlated with CXCR+ cells ($p < 0.01$). These results support the theory of CXCR3 and CCR5 being typical for Th1 response. As far as the Th2 response is concerned, there was nor positive neither negative correlation between IL4 and other cytokines or surface molecules. In healthy controls there was a positive correlation between CD30+ and CRTH2+ cells, nevertheless, this was not true in the patients.

Conclusion: Due to its relative ease and no need of artificial stimulation the determination of surface molecules is very convenient for studying the Th1/Th2 response in patients with various immunological disorders. We can clearly recommend CXCR3 and CCR5 molecules for the study of Th1 mediated diseases whereas for the right interpretation of the use of CD30 and CRTH2 further studies are still needed.

VÝVOJ HLADIN CYTOKINŮ V PRVNÍM ROCE ŽIVOTA DĚTÍ ALERGICKÝCH A NEALERGICKÝCH MATEK

Autoři: Mgr. Jan Žižka, Lodinová-Žádníková R., Kocourková I., Prokešová L.
Školitel: Doc. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc., Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Osídlování novorozenců probiotickým kmenem bakterie E. coli O83:K24:H31 (vakcína Colinfant) je prováděno již několik desítek let a jeho vliv na rozvoj alergií je znám. Doposud nebyl ovšem přesně objasněn mechanismus působení E. coli na organismus. Pro objasnění změn nastávajících po osídlení jsme sledovali produkci vybraných cytokinů a protilátek u zdravých matek a jejich dětí a u alergických matek a jejich neosídlených a osídlených dětí.

Metody: Hladiny cytokinů a protilátek byly stanovovány pomocí proteinových mikroarray a ELISA testy v sérech a mléce matek a v sérech a stolicích jejich dětí. Vzorky byly odebírány v den porodu, 4 dny a 3, 6 a 12 měsíců po narození.

Výsledky: Výsledky cytokinových mikroarray prokázaly rozdíly zejména v produkci některých chemokinů (např. vysoká úroveň IL-8 v kolostru zdravých i alergických matek v porovnání s se zralým mlékem). Metodou ELISA byly testovány



cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 IFN- γ a TFG- β a imunoglobuliny IgG, IgM a IgA. Významné rozdíly mezi sledovanými skupinami subjektů byly zejména zaznamenány v produkci: IL-4 (vyšší hladiny u alergiků, postupně se snižující na úroveň zdravých matek a dětí), IL-6 (snížené hladiny v sérech a stolicích osídlených dětí), IL-13 a IFN- γ (vysoké hladiny v sérech a stolicích jednoročních dětí alergických matek). Produkce protilátek proti E. coli byla ve všech vzorcích neosídlených alergických matek dětí snížena, zatímco množství protilátek ve vzorcích osídlených dětí byly srovnatelné s výsledky dětí zdravých matek. Dosud se u žádného z osídlených dětí alergických matek neprojevily příznaky alergického onemocnění, zatímco u neosídlených dětí alergických matek byly po jednom roce života projevy alergií diagnostikovány ve 25 % případů.

Závěr: Mezi zdravou a alergickou skupinou a mezi osídlenými a neosídlenými dětmi byly zaznamenány významné rozdíly. V některých případech lze pozorovat vyrovnání hladin sledovaných parametrů u dětí zdravých matek a osídlených dětí alergických matek. Všechny tři skupiny matek a jejich dětí budou i nadále sledovány i v dalších letech života.

Práce je podporována granty IGA MZ č. NR/8040-3 a GAČR 310/03/H147



Studenti při konferenci.

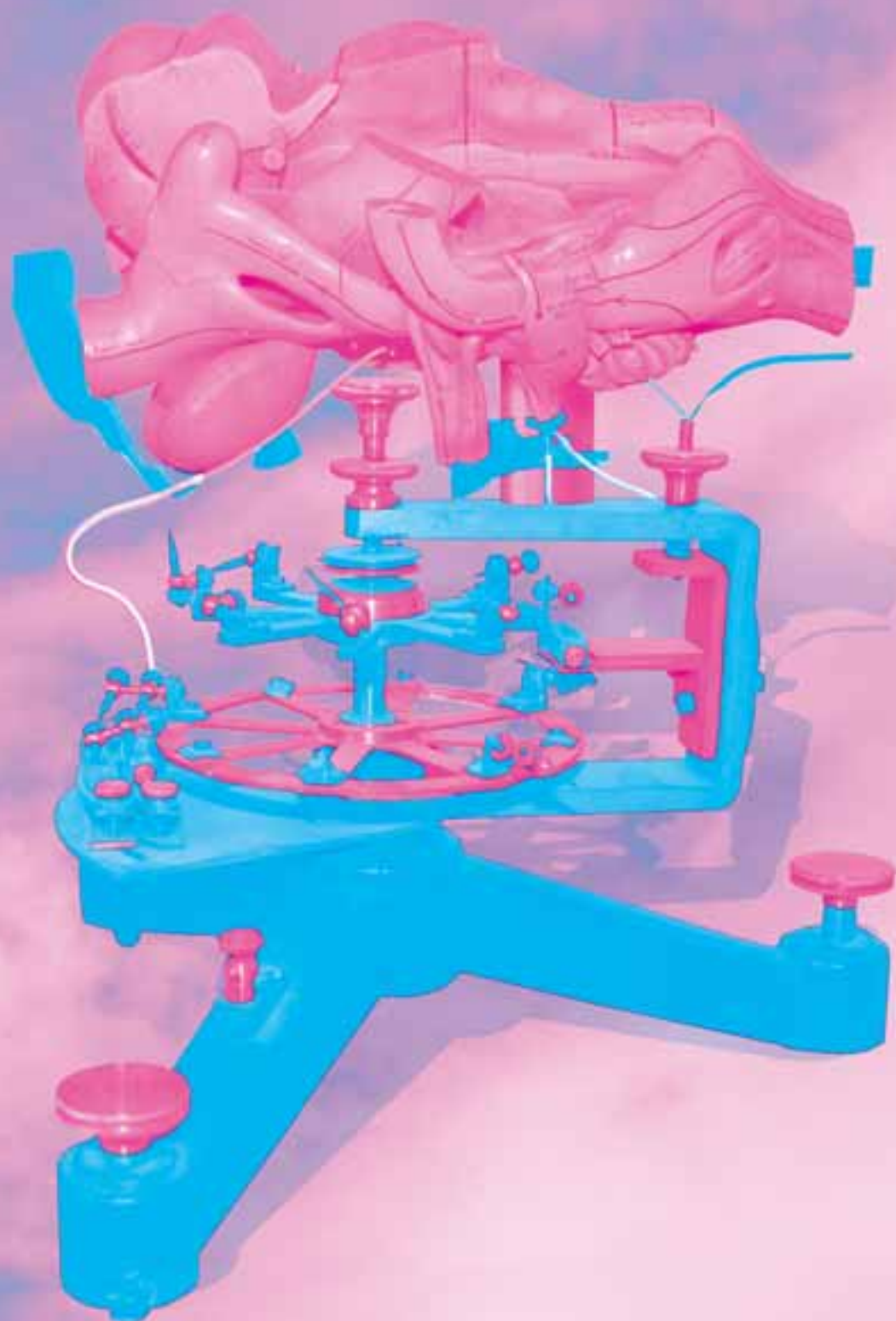


Sponzoři 6. ročníku SVK na 1. LF – PhDr. Lubomír Houdek (nakladatelství Galén, s.r.o.), MUDr. Miroslav Lomíček a PhDr. Jana Vytlačilová (nakladatelství Grada Publishing, a.s.) předávají ceny vítězům konference.



Předávání cen vítězům 6. ročníku studentské vědecké konference.

SEKCE PREGRADUÁLNÍ



VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO

SEKCE PREGRADUÁLNÍ

1. místo: Havránek Ondřej, 4. r.

Školitel: Odb. as. MUDr. Kleibl Zdeněk, Ph.D.

Název práce: Délka polyglutaminové domény genu *AIB1* jako prediktor vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací genu *BRCA1*

2. místo Klein Martin, 5. r.

Školitel: MUDr. Mysliveček Jaromír, Ph.D.

Název práce: Identifikace podtypů M5 muskarinových acetylcholinových receptorů v srdeční tkáni laboratorního potkana

3. místo Králík Lubomír, 4. r.

Školitel: Prof. MUDr. Matásek Pavel, DrSc.

Název práce: Nová mutace genu *ATP7A* u nemocného s Menkesovým syndromem

1. místo

DÉLKA POLYGLUTAMINOVÉ DOMÉNY GENU *AIB1* JAKO PREDIKTOR VZNIKU KARCINOMU PRSU U NOSIČEK MUTACÍ GENU *BRCA1*

Autor: Ondřej Havránek (4. ročník)
Školitel: Odb. as. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D., Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK



Ondřej Havránek

Abstrakt

Karcinom prsu patří mezi nejzávažnější nádorová onemocnění v populaci žen u nás. Ačkoliv většina nádorů vzniká jako sporadický karcinom, přibližně 5–10 % onemocnění je podmíněno hereditárně. Dominující příčinou dědičných forem karcinomu prsu u nás jsou mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Nosičky mutací genu *BRCA1* mají vysoké celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu, avšak věk nástupu onemocnění se u jednotlivých pacientek podstatně liší. V nedávné době byl popsán polymorfismus v polyglutaminové doméně koaktivátoru steroidního receptoru – genu *AIB1* (amplified in breast cancer gene 1) a jeho vliv na ovlivnění rizika vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací genu *BRCA1*. Cílem práce byla analýza polyglutaminové oblasti genu *AIB1* v české populaci u 94 pacientek se sporadickým karcinomem prsu, 92 nosiček mutací genu *BRCA1* (zdravých i nemocných karcinomem prsu) a u 86 zdravých kontrol. Polymorfni oblast genu *AIB1* kódující polyglutaminový řetězec byla amplifikována pomocí PCR. Pro separaci alel *AIB1* byla použita polyakrylamidová gelová elektroforéza s přidavkem Spreadexu nebo denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie (DHPLC) systému WAVE. Nejvyšší zastoupení měly ve všech analyzovaných populacích alely kódující 28 nebo 29 glutaminů. Analýza závislosti rizika vzniku nádoru na genotypu *AIB1* ukázala, že v populaci pacientek s mutací genu *BRCA1* a oběma alelami s <29 tripletů byl průměrný věk diagnózy karcinomu 45,1 let, zatímco u pacientek s alespoň jednou alelou s ≥29 tripletů 40,1 let. V populaci pacientek se sporadickým karcinomem prsu nebyl nalezen žádný vztah mezi genotypem *AIB1* a věkem vzniku nádoru. Domníváme se, že po potvrzení výsledků na větší skupině pacientek by bylo možné využít gen *AIB1* jako prediktor rizika vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací genu *BRCA1*.

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem v populaci dospělých žen v České republice. Většina případů vzniká sporadicky bez dědičného vlivu, 5–10 % na familiárním podkladě. Doposud bylo popsáno několik dědičných syndromů. Nejvýznamnější z nich je hereditární vznik karcinomu prsu na základě vrozené mutace hlavních predispozičních genů *BRCA1* nebo *BRCA2* (breast cancer gene 1 and 2). Analýza mutací genů *BRCA1/2* probíhá ve dvou univerzitních centrech v Praze a Brně od roku 1998 [3; 13]. Přes vysoké celoživotní riziko vzniku nádoru prsu a/nebo ovaria se věk nástupu onemocnění v jednotlivých případech velmi liší. Bylo popsáno několik rizikových faktorů prostředí a životního stylu, které ovlivňují věk vzniku nádoru u nosiček mutací genů *BRCA1/2*. Mezi nejdůležitější vlivy patří expozice pohlavním hormonům. Riziko vzniku nádoru mohou také významně ovlivňovat specifické alely jiných genů. Ve snaze najít vhodný prediktor rizika vzniku nádoru u nosiček mutací genů *BRCA1/2* byly analyzovány polymorfizmy a/nebo mutace řady genů (androgenní receptor, *RAD51*, *CHEK2*, *CYP17*) [8; 9; 11; 15]. V nedávné době byl popsán vztah rizika vzniku karcinomu prsu a polymorfismu polyglutaminové domény genu *SRC3* (steroid receptor coactivator 3, nazývaný také amplified in breast cancer 1 – *AIB1*), jehož genový produkt je zapojen do steroidní signální kaskády.

Gen *AIB1* (OMIM 601937) je umístěn na chromozómu 20 (20q12) a kóduje protein patřící do rodiny koaktivátorů steroidních receptorů (steroid receptor coactivator family, src). Proteiny této skupiny se podílejí na transaktivaci estrogeního receptoru a tím ovlivňují na estrogenech závislou transkripci (obr. 1).



OBR. 1. SCHÉMA TRANSAKTIVAČNÍHO KOMPLEXU ER. PO NAVÁZÁNÍ ESTROGENŮ VYTVOŘÍ ER DIMER, KTERÝ JE TRANSLOKOVÁN DO JÁDRA, KDE OBSAZUJE ER RESPONZIBILNÍ ELEMENT LOKALIZOVANÝ V REGULAČNÍCH OBLASTECH ESTROGENY OVLIVŇOVANÝCH GENŮ. KOAKTIVÁTOR ER (NAPŘ. *AIB1*) VE SPOLUPRÁCI S CBP/P300 PROTEINEM JSOU ZODPOVĚDNÉ ZA TRANSAKTIVACI TRANSKRIPČNÍHO KOMPLEXU. NAVÁZÁNÍ ZÁKLADNÍCH TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ – TATA BOX BINDING PROTEINU (TBP) A TBP-ASSOCIATED FAKTORŮ (TAFs) JE PODMÍNKOU PRO ASOCIACI S DNA-DEPENDENTNÍ RNA POLYMERÁZOU II (POL II) A INICIACI EXPRESE GENŮ ZÁVISLÝCH NA ESTROGENECH.

TABULKA 1 HLAVNÍ VÝSLEDKY PUBLIKOVANÝCH STUDIÍ POLYMORFISMU V POČTU GLUTAMINŮ GENU AIB1.

Počet zpracovaných vzorků	Základní výsledky	Frekvence alel genu AIB1 BRCA1/sporad. karc. prsu/kontroly
Haiman CA et al. (2000) [4] Sporadický karc. prsu = 484 Kontroly bez karc. prsu = 624	Case-control studie pacientek se sporadickým karcinomem prsu. Nejčastější alelotypy obsahují 28 a 29Q. Polymorfismus AIB1 není významným rizikovým faktorem pro vznik sporadického karcinomu prsu.	26Q: N.S. / 12,0 % / 11,9 % 28Q: N.S. / 40,4 % / 38,9 % 29Q: N.S. / 46,4 % / 47,8 %
Patel MS (2000) [12]*	–	26Q: N.S. / N.S. / 12,8 % 28Q: N.S. / N.S. / 37,0 % 29Q: N.S. / N.S. / 50,2 %
Rebeck TR et al. (2001) [14] BRCA1 bez karc. prsu = 326 BRCA1 s karc. prsu = 330 Sporadický karc. prsu = 278 Kontroly bez karc. prsu = 170	Nosičky mutací BRCA1 mají vyšší riziko vzniku karcinomu prsu, mají-li AIB1 s \geq 28Q (OR 1,59) nebo \geq 29Q (OR 2,85). Pozdní věk narození prvního dítěte a bezdětnost jsou spojeny s vyšším rizikem karcinomu prsu.	26Q: 12,2 % / 16,8 % / N.S. 28Q: 36,0 % / 41,8 % / N.S. 29Q: 50,0 % / 40,3 % / N.S.
Dai P and Wong LJ (2003) [2] BRCA1 s karc. prsu = 16 Sporadický karc. prsu = 32 Kontroly bez karc. prsu = 43	Počet pacientek se sporadickým karcinomem prsu, které mají alespoň jednu alelu \leq 27 Q, je významně vyšší než u pacientek s karcinomem prsu a mutací genu BRCA 1/2 nebo než v kontrolní populaci.	26Q: 10,3 % / 16,0 % / 18,7 % 28Q: 51,7 % / 33,3 % / 32,0 % 29Q: 31, % / 25,9 % / 44,0 %
Kadouri L et al. (2004) [7] BRCA1 bez karc. prsu = 116 BRCA1/2 s karc. prsu = 195	Analyzovaná populace Židů Aškenaziů. RR pro karcinom prsu nosiček mutací genu BRCA1 je 0,55 (95 % CI=0,34-0,90) pro pacientky s alespoň jednou alelou \leq 26Q a 1,29 (95 % CI=0,85-1,96) pro pacientky s 2 alelami \geq 29Q ($p=0,025$).	26Q: 9,5 % / N.S. / N.S. 28Q: 42,6 % / N.S. / N.S. 29Q: 46,2 % / N.S. / N.S.
Hughes DJ at al. (2005) [5] BRCA1 mut. = 851 BRCA2 mut. = 324 642 z nich s karc. prsu	Ženy s alelami \geq 28 Q nemají zvýšené riziko karcinomu prsu oproti ženám majícím alely s méně glutaminy (HR pro nosičky mutací BRCA1/2=0,88; 95% CI=0,75-1,04).	26Q: 13,0 % / N.S. / N.S. 28Q: 40,0 % / N.S. / N.S. 29Q: 46,0 % / N.S. / N.S.

N.S. – Nebylo stanovováno

* Analýza polymorfismu genu AIB1 ve vztahu ke vzniku osteoporózy. Do studie nebyly zařazeny pacientky s karcinomem prsu.

Polypeptidový řetězec genu *AIB1* o 160 kDa tvoří 1417 aminokyselinových zbytků. V proteinu bylo identifikováno několik funkčních domén. Basic helix-loop-helix (bHLH) doména na NH₃⁺ konci proteinu, nejméně dvě domény interagující s receptorem (receptor-interaction domains, RIDs) v centrální oblasti, oblast zodpovědná za kooperaci s kointegrátorem CBP/P300 (CBP-interaction domain, CID) a histonacetyltransferázová doména (HAT) ležící v blízkosti COO⁻ konce proteinového řetězce [1]. Detailní krystalografická struktura proteinu však není dosud známa. Polymorfní glutaminová (Q) doména, kódovaná tripletty CAG a CAA, se nachází v blízkosti COO⁻ konce proteinu. Dle blíže příbuzného proteinu SRC-1 obsahujícího obdobnou polyglutaminovou doménu se dá předpokládat, že tato doména přímo interaguje s estrogením receptorem a ovlivňuje jeho transaktivaci.

V minulosti bylo publikováno několik studií, které analyzovaly polyglutaminovou doménu genu *AIB1* jako možný prediktor rizika vzniku sporadického karcinomu prsu a karcinomu prsu u nosiček mutací genu *BRCA1/2* (tab. 1). Vzhledem k rozdílným výsledkům těchto studií a k častému rozdílnému zastoupení genotypů v různých populacích jsme se rozhodli provést analýzu v naší populaci.

Cílem práce byla analýza genotypů *AIB1* v české populaci u pacientek se sporadickým karcinomem prsu, nosiček mutací genu *BRCA1* (zdravých i nemocných s karcinomem prsu) a u kontrolní populace pomocí alternativních technik k přímému sekvenování nebo fragmentační analýze s použitím fluorescentně značených primerů. Korelací s klinickými údaji byl analyzován vztah typu polyQ domény genu *AIB1* k riziku vzniku karcinomu prsu.

Metody

K izolaci DNA z periferní žilní krve byl použit Wizard Blood DNA isolation kit (Promega). Celkově bylo analyzováno 92 pacientek se sporadickým karcinomem prsu, 39 pacientek s karcinomem prsu a mutací genu *BRCA1*, 53 vzorků od zdravých nosiček mutací genu *BRCA1* a 86 vzorků zdravé populace. Konfirmace informovaného souhlasu s genetickým vyšetřením předcházela odběru genetického materiálu.

Pro PCR amplifikaci bylo použito 50 ng genomové DNA. Primery ohraničující oblast kódující polyglutaminovou doménu byly uzpůsobeny dle Kadouriho bez florescenčního značení [7]. 25ml reakční směs pro PCR se skládala z 30 pM každého primeru [sense: 5'-TCCGACAACAGAGGGTGGCTATG-3'; antisense: 5'-TTAGAGGTGGGCTGAAG-GCCTG-3'; Generi Biotech], z 2,5 ml GoldTaq PCR pufru (Applied Biosystems), 0,5 U GoldTaq DNA polymerázy (Applied Biosystems), 1,5 mM MgCl₂ a z 12,5 mM dNTP's (Invitex). PCR reakce, sestávající z úvodní denaturace 95 °C 10 min, 35 cyklů o 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s a závěrečného dosyntetizování ampliconů 72 °C 10 min, byla provedena v PTC200 PCR cycleru (MJ Research).

Následná analýza zahrnovala rozdělení PCR fragmentů na 12% polyakrylamidovém gelu (Bio-Rad) s přidávkem Spreadex Polymer NAB (Elchrom Scientific) ve vertikální elektroforéze Miniprotean (Bio-Rad). Rozlišovací schopnost spreadexového gelu umožňuje na 5 cm dlouhém gelu úplné oddělení dvou DNA fragmentů, které se délkově liší o 1 bp [6]. Gely byly barveny 15 min 0,1% roztokem SYBR gold (Molecular Probes) a vizualizovány UV.

Jako alternativa ke spreadexovým gelům byla užita fragmentační analýza PCR ampliconů denaturační vysokotlakou kapalinovou chromatografií (DHPLC) systému WAVE 3500 (Transgenomic Inc.). Pro DHPLC analýzu bylo kombinováno 20 ml PCR ampliconů genu *AIB1* s 4 ml 191 bp dlouhého PCR ampliconu (genu *CHEK2*) sloužícího jako vnitřní standard [10]. Na kolonu (DNASep cartridge, Transgenomic) bylo nanášeno 10 ml směsi PCR produktů. Eluce DNA byla provedena 10minutovou aplikací lineárního gradientu (40–60 %) Pufu B (25% acetonitril) v 0,1 M trietylamonium acetátu. Chromatogramy získané na UV detektoru při vlnové délce 260 nm byly analyzovány softwarem Navigator (Transgenomic).

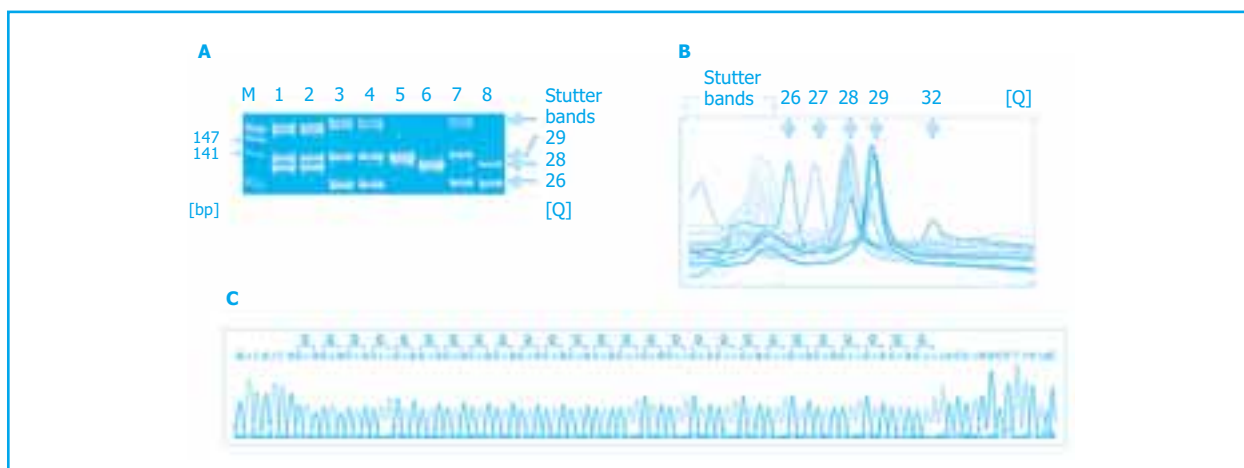
Přímé sekvenování amplifikovaných vzorků homozygotů bylo užito k určení přesné délky různých alel. Analýza proběhla na automatickém sekvenátoru ABI310 (Applied Biosystems) pomocí BigDye Terminator Kitu 3.1 (Applied Biosystems).

Klinická data byla k dispozici pouze u 53 z 94 vzorků od pacientek se sporadickým karcinomem prsu, proto byla v této skupině k analýze užita menší populace. Vzhledem ke zjištěné délce alel byly populace rozděleny do dvou částí, na skupinu s ≤ 28 glutaminy a skupinu s ≥ 29 glutaminy.

Výsledky a diskuse

K analýze délky polyglutaminové domény genu *AIB1* jsme zvolili dva nové metodické přístupy. Výsledky při použití PAGE se Spreadexem dokumentuje obr. 2A. Přítomnost stutter bandů v elektroforéze, kterým odpovídají stutter peaky u DHPLC analýzy, je způsobena nepřesností Taq polymerázy při PCR. Druhou metodou byla fragmentační analýza pomocí DHPLC (obr. 2B). Sekvenování umožnilo určení přesné délky jednotlivých alel (obr. 2C).

Zastoupení alel a genotypů *AIB1* v analyzovaných populacích je shrnuto v tabulce 2. Nejčastější alely obsahují 26, 28 nebo 29 glutaminů, nejčastější genotypy jsou 28/28, 28/29 a 29/29. Mezi jednotlivými populacemi nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v délce polyglutaminové domény genu *AIB1*.



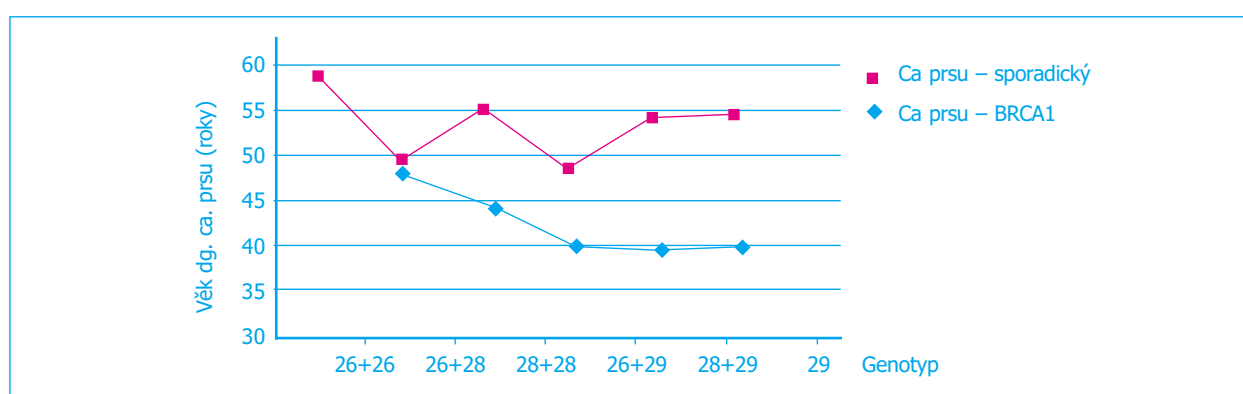
OBR. 2. VYBRANÉ VÝSLEDKY ANALÝZY DÉLKY POLYGLUTAMINOVÉ DOMÉNY GENU AIB1 POMOCÍ SPREADEXOVÉHO GELU (A) A DHPLC (B). SEKVENOVÁNÍ PCR AMPLIKONU HOMOZYGOTA S 26 GLUTAMINOVÝMI CAG A CAA TRIPLETY (C).

TABULKA 2A ČETNOST ALEL GENU AIB1

Alely (počet glutaminů)	Nosičky mutací genu BRCA1 (N=92)	Pacientky se sporadickým karcinomem prsu (N=94)	Kontroly (N=86)
25	0 %	0 %	0,6 %
26	10,9 %	12,8 %	12,8 %
27	1,1 %	0 %	0 %
28	41,8 %	42,6 %	34,3 %
29	44,6 %	44,7 %	51,2 %
30	1,1 %	0 %	0,6 %
31	0,5 %	0 %	0 %
32	0 %	0 %	0 %
33	0 %	0 %	0,60 %

TABULKA 2B ZASTOUPENÍ GENOTYPŮ GENU AIB1

Alely (počet glutaminů)	Nosičky mutací genu BRCA1 (N=92)	Pacientky se sporadickým karcinomem prsu (N=94)	Kontroly (N=86)
25/26	0	0	1
26/26	1	2	2
26/28	7	11	4
26/29	11	9	13
27/29	1	0	0
27/30	1	0	0
28/28	19	17	11
28/29	31	35	32
28/30	1	0	0
28/33	0	0	1
29/29	19	20	21
29/30	1	0	1
29/31	1	0	0



OBR. 3. VĚK DIAGNÓZY U SPORADICKÉHO KARC. PRSU (N=65) A KARC. PRSU U NOSIČEK MUTACÍ BRCA1 (N=37) VZHLEDEM K RŮZNÝM GENOTYPŮM AIB1.

Průměrný věk vzniku karcinomu prsu u pacientek s mutací genu *BRCA1* se od průměrného věku pacientek bez mutace v naší studii významně liší (41,3 vs 53,8; $p < 0,001$). Tento rozdíl je způsoben vlivem mutace genu *BRCA1* na vznik nádoru prsu u postižených jedinců. Průměrný věk diagnózy sporadického i hereditárního karcinomu prsu u nejčastějších genotypů shrnuje obr. 3. U sporadického karcinomu prsu nevidíme žádný vliv na věk vzniku onemocnění, naproti tomu můžeme vidět snížení věku diagnózy karcinomu prsu u nosiček mutací genu *BRCA1*, když je přítomna alespoň jedna alela s 29 glutaminy. Průměrný věk diagnózy ve skupině sporadického karcinomu prsu s < 29 a ≥ 29 glutaminy je 53,4 a 54,2 roků, ve skupině pacientek s mutací genu *BRCA1* 45,1 a 40,1 roků. Přítomnost alely s ≤ 26 glutaminy nesnižuje riziko vzniku karcinomu prsu ani u jedné z analyzovaných populací.

Všechny studie, které zkoumaly polymorfismus genu *AIB1*, byly založeny na analýze sekvenováním nebo užívaly automatické sekvenátory s fluorescenčně značenými primery. V naší studii jsme ukázali, že metody spreadexová PAGE a DHPLC jsou výborně použitelné k analýze polymorfismu genu *AIB1* a jsou ekonomicky mnohem výhodnější. V minulosti bylo popsáno rozdílné zastoupení alel polymorfismu různých genů v rámci Evropy [9]. Současná studie neprokázala odlišnosti mezi frekvencí genotypů *AIB1* v naší populaci a populacích zahraničních. Nejčastěji se vyskytující alely kódují 28 nebo 29 glutaminů. Ve shodě se studiemi Rebbecka a Kadouriho [7; 14] a oproti poslední a nejrozsáhlejší studii Hughese et al. [5] byl nalezen vztah mezi přítomností alely *AIB1* s ≥ 29 glutaminovými triplety a věkem vzniku karcinomu prsu u pacientek s mutací v genu *BRCA1*. Bohužel, dosavadní výsledky nedosahují statistické významnosti z důvodu malého počtu vyšetřených a je nutné je potvrdit zahrnutím většího počtu pacientů s mutací genu *BRCA1*. Nízký výskyt mutací v genu *BRCA2* v České republice omezuje možnosti kvalitní analýzy této skupiny.

Poděkování

Rád bych poděkoval Markétě Janatové z Ústavu biochemie a exp. onkologie 1. LF UK za pomoc se spreadexovou PAGE, Petru Pohlreichovi z Ústavu biochemie a exp. onkologie 1. LF UK za poskytnutí vzorků od pacientek s mutací genu *BRCA1* a Janu Novotnému z Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN za pomoc při získání genetického materiálu a klinických dat.

Práce vznikla s podporou grantu Ligy proti rakovině a Výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky č. MSM0021620808.



Literatura

1. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM: Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 1997;90:569-580.
2. Dai P, Wong LJ: Somatic instability of the DNA sequences encoding the polymorphic polyglutamine tract of the AIB1 gene. *J Med Genet.* 2003;40:885-890.
3. Foretova L, Machackova E, Navratilova M, Pavlu H, Hrubá M, Lukesova M, Valik D: BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Hum.Mutat.* 2004;23:397-398.
4. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Brown M, Hunter DJ: Polymorphic repeat in AIB1 does not alter breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 2000;2:378-385.
5. Hughes DJ, Ginolhac SM, Coupier I, Barjhoux L, Gaborieau V, Bressac-de-Paillerets B, Chompret A, Bignon YJ, Uhrhammer N, Lasset C, Giraud S, Sobol H, Hardouin A, Berthet P, Peyrat JP, Fournier J, Nogues C, Lidereau R, Muller D, Fricker JP, Longy M, Toulas C, Guimbaud R, Yannoukakos D, Mazoyer S, Lynch HT, Lenoir GM, Goldgar DE, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM: Breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and polyglutamine repeat length in the AIB1 gene. *Int.J Cancer* 2005.
6. Janatova M, Pohlreich P, Matous B: Detection of the most frequent mutations in BRCA1 gene on polyacrylamide gels containing Spreadex Polymer NAB. *Neoplasma* 2003;50:246-250.
7. Kadouri L, Kote-Jarai Z, Easton DF, Hubert A, Hamoudi R, Glaser B, Abeliovich D, Peretz T, Eeles RA: Polyglutamine repeat length in the AIB1 gene modifies breast cancer susceptibility in BRCA1 carriers. *Int.J Cancer* 2004;108:399-403.
8. Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, Durocher F, Abeliovich D, Glaser B, Hamburger T, Eeles RA, Peretz T: A single-nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies breast cancer risk in BRCA2 carriers, but not in BRCA1 carriers or noncarriers. *Br.J Cancer* 2004;90:2002-2005.
9. Kleibl Z, Novotny J, Bezdickova D, Malik R, Kleiblova P, Foretova L, Petruzalka L, Ilencikova D, Cinek P, Pohlreich P: The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Res.Treat.* 2005;90:165-167.
10. Kleibl Z, Novotny J, Pohlreich P, Zikan M, Cinek P, Janatova M, Petruzalka L: Low frequency of CHEK2 1100delC mutation in breast cancer patients and hereditary breast cancer families in the Czech Republic. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2004;22:9538.
11. Liede A, Zhang W, Leon Matsuda ML, Tan A, Narod SA: Androgen receptor gene polymorphism and breast cancer susceptibility in The Philippines. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2003;12:848-852.
12. Patel MS, Cole DE, Smith JD, Hawker GA, Wong B, Trang H, Vieth R, Meltzer P, Rubin LA: Alleles of the estrogen receptor alpha-gene and an estrogen receptor cotranscriptional activator gene, amplified in breast cancer-1 (AIB1), are associated with quantitative calcaneal ultrasound. *J Bone Miner.Res* 2000;15:2231-2239.
13. Pohlreich P, Stribrna J, Kleibl Z, Zikan M, Kalbacova R, Petruzalka L, Konopasek B: Mutations of the BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. *Med.Princ.Pract.* 2003;12:23-29.
14. Rebbeck TR, Wang Y, Kantoff PW, Krithivas K, Neuhausen SL, Godwin AK, Daly MB, Narod SA, Brunet JS, Vesprini D, Garber JE, Lynch HT, Weber BL, Brown M: Modification of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer risk by AIB1 genotype and reproductive history. *Cancer Res* 2001;61:5420-5424.
15. Spurdle AB, Hopper JL, Dite GS, Chen X, Cui J, McCredie MR, Giles GG, Southey MC, Venter DJ, Easton DF, Chenevix-Trench G: CYP17 promoter polymorphism and breast cancer in Australian women under age forty years. *J Natl.Cancer Inst.* 2000;92:1674-1681.

2. místo

IDENTIFIKACE PODTYPŮ M_5 MUSKARINOVÝCH ACETYLCHOLINOVÝCH RECEPTORŮ V SRDEČNÍ TKÁNI LABORATORNÍHO POTKANA

Autor: Martin Klein (5. ročník)

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

Přednosta: Prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.



Martin Klein

Souhrn

Muskarinové receptory jsou receptory spřažené s G-proteiny a dosud bylo identifikováno pět podtypů. Expresie jednotlivých podtypů je relativně tkáňově specifická. Srdce savců je považováno za orgán s predominantním zastoupením M_2 podtypu (muskarinová populace u ptáků se skládá z M_2 a M_4 receptorů). Pokusili jsme se identifikovat jiné podtypy muskarinových receptorů než M_2 . K tomu jsme použili vazebné kompetiční pokusy s AQ-RA 741 a blokování M_1 – M_4 receptorů pomocí kombinace MT7 a AQ-RA 741. Identifikovali jsme malé množství (v průměru 14,4 %) non- M_2 subtypu muskarinových receptorů, které pravděpodobně patří k podtypu M_1 . Dále jsme identifikovali marginální frakci ($5,50 \pm 1,63$ %) receptorů podtypu M_5 . Tyto výsledky představují další důkaz přítomnosti M_5 podtypu muskarinových receptorů v periferní tkáni.

Klíčová slova: muskarinové receptory; srdce; non- M_2 muskarinové receptory; MT7 mamba toxin.

Úvod

Jednou z nejdůležitějších cest mezibuněčné komunikace je přenos signálu zprostředkovaný receptory. Muskarinové receptory patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny a přenášejí signály parasymptiku. Dosud bylo identifikováno a klonováno pět podtypů muskarinových receptorů. Liché subtypy (M_1 , M_3 , M_5) stimulují fosfolipasu C (PLC; přes pertusis toxin-insenzitivní Gq protein), která poté štěpí fosfatidilinositolbisfosfát (PIP2) to inositoltrisfosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG).

Sudé podtypy (M_2 , M_4) oproti tomu inhibují adenyl cyklu (AC; cestou pertusis toxin-senzitivního Gi proteinu), tedy snižují množství cyklického adenosinmonofosfátu (Moscona-Amir et al., 1989) a snižují aktivitu proteinkinasy A (PKA).

Po dlouhou dobu se předpokládalo, že jediným podtypem MR, přítomným v savčích srdcích je M_2 receptor. Toto také bylo podpořeno studií s M_2 knockoutovanými myši (Gomez et al., 1999). Nicméně, v poslední době se koncept srdce jako plně orgánu s úplnou homogenitou podtypů muskarinových receptorů opět stává předmětem zájmu. Některé fyziologické a farmakologické předpoklady podporující myšlenku existence dalších populací muskarinových receptorů v srdcích savců stručně shrnuje Dhein et al., 2001.

V naší předešlé práci (Mysliveček et al., 2001) jsme zjistili že:

1. V srdečních síních se nachází pouze uniformní populace M_2 muskarinových receptorů,
2. V komorách se nalézají dvě populace, přičemž není pochyb, že majoritní je tvořena M_2 receptory.
3. Minoritní populace je představována M_1 subtypem. Nelze však zcela jednoznačně vyloučit možnost, že je přítomna ještě další populace (zřejmě M_5 receptorů); toto jsme zjistili použitím následujících postupů:
 - a) kompetiční vazebné pokusy s AQ-RA 741,
 - b) blokadou M_1 – M_4 receptorů inkubací s AQ-RA 741 a MT7.

Materiál a metodika

Reagencie

$[^3\text{H}]$ NMS (*[methyl- ^3H]-N-scopolamin methyl chlorid, sp. a. 84 Ci/mmol*) z Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, England). AQ-RA 741 (*((11-({4-[4-(diethylamino)butyl]-1-piperidinyl}acetyl)-5,11-dihydro-6H-pyrido(2,3-b))* laskavě darováno firmou Boehringer Ingelheim, Biberach, Německo, MT7 (*muskarinový toxin 7, toxin zelené mamby*) z Peptide Institute, Inc., Louisville, Kentucky, USA.

Pokusná zvířata a příprava tkáňových homogenátů

Pokusy jsme prováděli na dospělých samcích laboratorních potkanů kmene Wistar starých 46–55 dní. Se zvířaty jsme zacházeli v souladu s platnou legislativou České republiky a Helsinskou deklarací. Zvířata jsme usmrtili cervikální dislokací a dekapitací. Srdeční komory jsme vypreparovali, vazivovou tkáň pečlivě oddělili a po zvážení a rozkrájení na drobné kousky jsme po dobu 30–45 vteřin homogenizovali homogenizátorem (Ultra-Turrax® T25 basic IKA®-Werke 24,000 r.p.m.) v ledovém fyziologickém roztoku. Homogenát (100 mg/ml) jsme poté zamrazili při -20 °C do provedení vazebných pokusů. Homogenáty jsme pak před vlastním pokusem rehomogenizovali.

Radioligandový vazebný pokus s AQ-RA 741 (antagonista relativně selektivní pro M_5 receptory)

Kompetiční vazebné studie jsme provedli za použití radioligandu $[^3\text{H}]$ NMS modifikovaným postupem, použitým již dříve (Mysliveček et al., 2003). Množství homogenátu, odpovídající 2,5 mg čerstvé tkáně na zkumavku jsme inkubovali 90 minut při 25 °C v celkovém objemu 0,25 ml. Jako inkubační médium jsme použili fyziologický roztok a $[^3\text{H}]$ NMS (1800 pM).

Nespecifickou vazbu jsme stanovovali ve zkumavkách s atropinem, přidaným před započítáním inkubace (výsledná koncentrace 5 μM). Inkubaci jsme ukončovali zředěním ledovou destilovanou vodou a rychlou filtrací přes filtry ze skleněných vláken Whatman GF/B na Brandel cell-harvesteru. Filtry jsme promývali destilovanou vodou a zadržovanou radioaktivitu jsme měřili kapalinovou scintilační spektrometrií. Rozsah použitých koncentrací AQ-RA 741 byl od 10^{-10} do 10^{-5} mol.l⁻¹, při třech různých koncentracích na řád.

Stanovení přítomnosti M₅ muskarinových receptorů

Stanovení přítomnosti M₅ muskarinových receptorů jsme provedli za použití modifikované metody Reeve et al. (1997). Tito autoři použili preinkubaci tkáně v 30 $\mu\text{g/ml}$ toxinu zelené mambý a 1 μM AQ-RA741 pro zablokování ostatních muskarinových receptorů než M₅. Tato metoda blokovala 99 % M₁, M₂, a M₄ receptory a 85 % M₃ receptorů, zatímco zachovávala většinu M₅ receptoru. Zbylé receptory pak měřili vazbou s [³H]NMS. V našem pokusu jsme použili podobný postup a použili jsme MT7 toxin místo surového jedu. Tkáň jsme preinkubovali 60 minut s MT7 toxinem (10^{-6} mol/l) a s AQ-RA 741 (10^{-6} mol/l) a poté jsme ji inkubovali 90 minut s [³H]NMS.

Zpracování dat

Data, získaná z vazebných pokusů s radioligandem jsme zpracovali podle dřívějšího postupu (Mysliveček et al, 2003), za použití softwaru GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

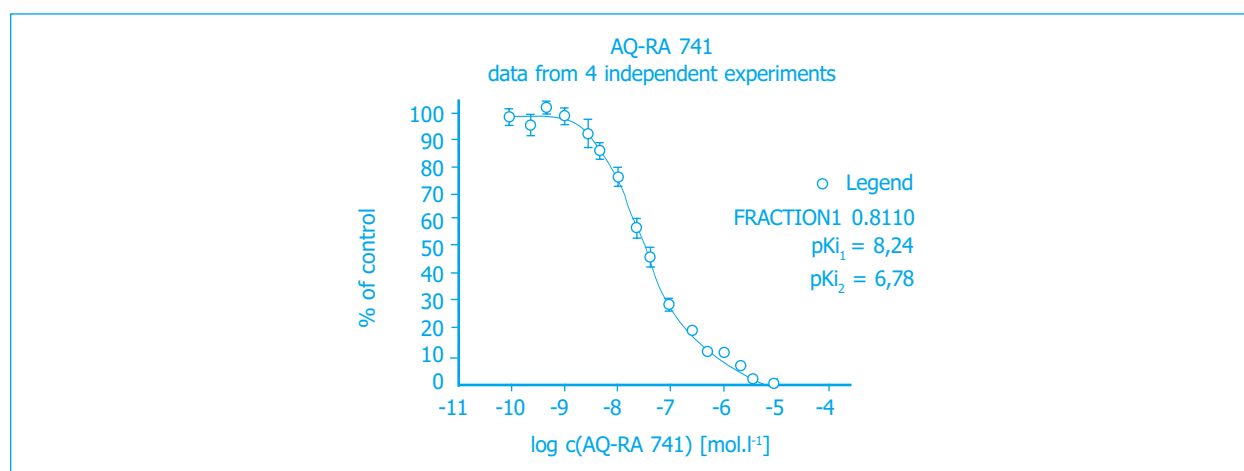
Výsledky

Radioligandový vazebný pokus s AQ-RA 741

Kompetice jsme provedli v celých srdečních komorách bez rozlišení na pravé a levé komory. Vazebné kompetiční pokusy s AQ-RA 741 (10^{-10} až 10^{-5} mol.l⁻¹, 3 koncentrace na řád) ukázaly přítomnost dvou vazebných míst. Data (pK_{B1}, pK_{B2} a frakce 1) jsou souhrnně uvedena v tabulce 1. Saturační křivka je na obrázku 1.

TABULKA 1 PK_{B1}, PK_{B2} A FRAKCE 1 AQ-RA 741

Kompetitor	Frakce 1	pK _{B1} nebo pK _B	pK _{B2}
AQ-RA 741	0,81±0,11	8,24±0,16	6,78±0,88



OBR. 1. SATURAČNÍ KŘIVKA AQ-RA 741

Kompetiční vazebný pokus s AQ-RA 741 ve tkáni preinkubované s MT7

Společná inkubace s AQ-RA741 a MT7 toxinem ukázala přítomnost 5,50±1,63 % M₅ muskarinových receptorů.

Diskuse

Saturační křivka antagonisty AQ-RA 741 dokazuje přítomnost dvou vazebných míst v srdečních komorách potkanů. Je zřejmé, že majoritní populace muskarinových receptorů patří k subtypu M₂. pK_{B2} AQ-RA 741 naznačuje přítomnost více subpopulací, avšak jako taková nemůže sama vyloučit přítomnost ostatních lýchých subtypů, protože vypočítaná hodnota pK_{B2} leží mezi odhadovanými hodnotami subtypů M₁, M₃ a M₅. Proto, abychom identifikovali tento minoritní podtyp, jsme provedli kompetici s koinkubací AQ-RA 741 a MT7. Tato kombinace prokázala přítomnost 5,50±1,63 % M₅ muskarinových receptorů v srdečních komorách potkanů. Můžeme tedy uzavřít s tvrzením, že jsme byli v našem pokusu schopni nalézt více než jednu subpopulaci muskarinových receptorů v srdečních komorách. Hlavní subpopulace náleží podtypu M₁ (viz část Úvod). Další subpopulace je představována muskarinovým receptorem podtypu M₅, jak lze

usuzovat z koinkubace s AQ-RA 741 a MT7. Tento nález je významný zejména z toho pohledu, že dosud byl výskyt podtypu M_5 považován za zejména centrální. Úloha M_5 muskarinového receptoru v srdci zůstává nadále předmětem dalšího výzkumu.

Poděkování

Rádi bychom vyjádřili dík firmě Boeringer Ingelheim, Bierbach, Německo (Dr. Doods a Dr. Mueller) za laskavé darování látky AQ-RA 741 a slečně Evě Šimákové za technickou výpomoc. Tato práce byla podpořena granty 36/04 a 39/05 GAUK Grantové Agentury University Karlovy a grantem NATO LST.EAP.CLG.980745.

Literatura

- Dhein S, van Koppen CJ, Brodde OE. (2001) Muscarinic receptors in the mammalian heart. Pharmacol Res 44: 161-82*
- Gomez J, Shannon H, Konstenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J (1999) Pronounced Pharmacologic Deficits in M_2 Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. PNAS 96: 1692-1697*
- Moscona-Amir E, Henis YI, Sokolovsky M (1989) Aging of Rat Heart Myocytes Disrupts Muscarinic Receptor Coupling That Leads to Inhibition of CAMP Accumulation and Alters the Pathway of Muscarinic-Stimulated Phosphoinositide Hydrolysis. Biochemistry 28: 7130-7137*
- Mysliviček J, Trojan S, Tuček S (2001) Different expression of the subtypes of muscarinic receptors in rat cardiac atria and ventricles. Physiol Res. 50: 19*
- Mysliviček J, Řičný J, Kolář F, Tuček S (2003) The Effects of Hydrocortisone Treatment on the Rat Heart Muscarinic and Adrenergic α_1 , β_1 and β_2 Receptors, Propranolol-Resistant Binding Sites and on Some Consequent Steps in Intracellular Signaling. NS Arch Pharmacol 368: 366-376*
- Reever CM, Ferrari-DiLeo G, Flynn DD. The M_5 (m_5) receptor subtype: fact or fiction? (1997) Life Sci. 60: 1105-1112*

3. místo

NOVÁ MUTACE GENU ATP7A U NEMOCNÉHO S MENKESOVÝM SYNDROMEM

Autor: Lubomír Králík (4. ročník)

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



Lubomír Králík

Úvod

Menkesova choroba je vzácně se vyskytující onemocnění s těžkou poruchou metabolismu mědi. Postižení muži trpí celkovým nedostatkem mědi v důsledku narušení příjmu mědi ve střevě a chybné distribuce mědi v těle projevující se poruchou pojivových tkání, vážnými neurodegenerativními změnami a změnou struktury vlasů. Dědičnost Menkesova syndromu je recesivní vázaná na chromosom X s výskytem 1:30000. Většina nemocných, pokud nejsou léčeni, zemře do věku tří let.

Menkesův syndrom je způsoben poruchou proteinu ATP7A, ATPasy transportující měď, která vede k hromadění mědi v cytosolu a poruše výdeje mědi z buněk. Většina příznaků Menkesova syndromu je důsledkem poruchy výdeje mědi ze střeva, která vede k celkovému nedostatku mědi v těle, což se projeví hlavně snížením až ztrátou aktivity enzymů, které měď vyžadují jako kofaktor pro svou funkci. Účastní se tvorby energie v mitochondriích (cytochrom c oxidasa), příjmu železa (ceruloplasmin), regulace množství kyslíkových radikálů (superoxiddismutasa), tvorby melaninu (tyrosinasa), produkce katecholaminu (dopamin β -monooxygenasa) a síťování kolagenu a elastinu (lysoxidasa). Nízká hladina mědi a ceruloplasminu v krvi a vysoká hladina mědi v kultivovaných fibroblastech jsou využívány v diagnostice onemocnění.

Gen ATP7A je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu X (Xq13.3), zaujímá oblast 140 kb genomové DNA. Transkript genu ATP7A je 8,5 kb dlouhý, obsahuje 23 exonů a kóduje protein o 1500 aminokyselinách. Gen ATP7A je exprimován ve všech tkáních mimo játra. Dosud bylo popsáno více než 130 mutací v genu ATP7A u nemocných s Menkesovým syndromem (Gu et al., 2001; Hahn et al., 2001; Seidel et al., 2001).

Práce uvádí výsledky mutační analýzy genu ATP7A u dvou nepříbuzných nemocných s Menkesovým syndromem z České republiky.

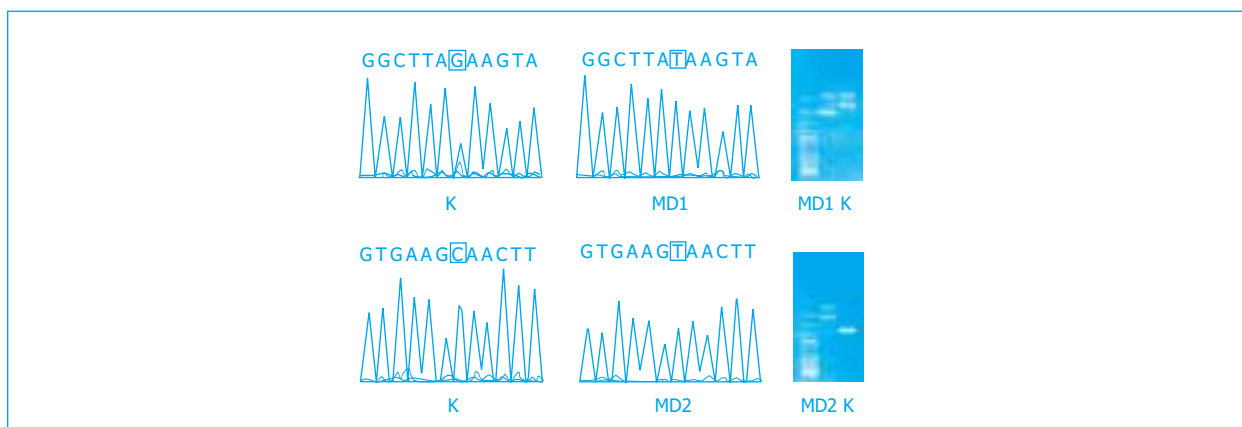
Metodika

Vyšetřeni byli dva nemocní s typickými příznaky Menkesova syndromu z nepříbuzných rodin.

Genomová DNA byla izolována z lymfocytů periferní krve. Pro amplifikaci každého z 23 exonů genu ATP7A byla navržena polymerasová řetězová reakce (PCR). Reakce probíhala v celkovém objemu 25 μ l ve složení 50 mM Tris HCl (pH 9,2), 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,5 mM MgCl_2 , 200 nM každý dNTP, 7,5 U Taq polymerasy a 0,4 μ m oba primery (Tumer et al., 1997) (Tab. 1.). Počáteční denaturace byla provedena při 95 °C 2 minuty, následovalo 30 cyklů s denaturací při 95 °C (30 s), nasedáním primerů při 59 °C (30 s) a extenzí při 72 °C (1 min), a závěrečná polymerace při 72 °C (7 min).

Všechny produkty PCR byly sekvenovány.

Zjištěné změny sekvence byly ověřeny restrikčním štěpením (Obr. 1.).



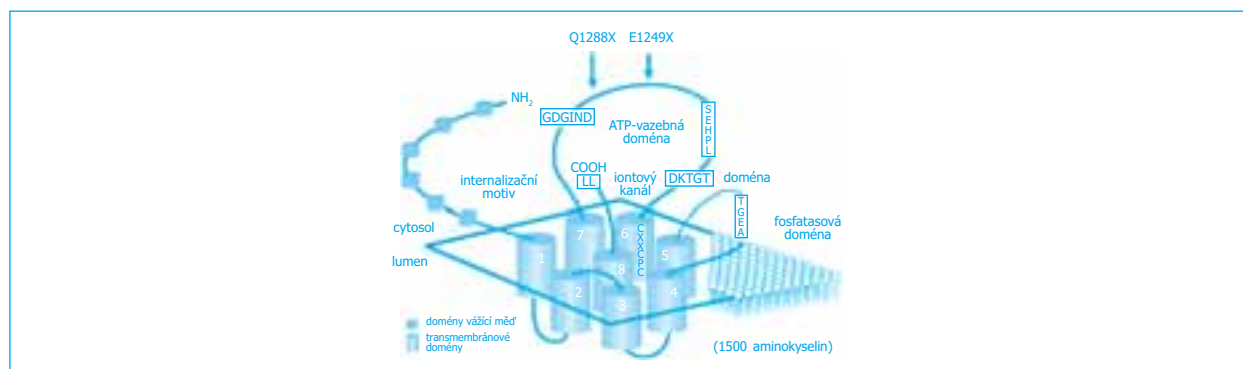
OBR. 1. SEKVENCE NUKLEOTDŮ A ANALÝZA POLYMORFISMU DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ MD1, MD2 – PACIENTI S MENKESOVÝM SYNDROMEM, K – NEGATIVNÍ KONTROLA

TABULKA 1 PRIMERY POUŽITÉ K AMPLIFIKACI GENU ATP7A

Exon	Přímý primer (5'→3')	Zpětný primer (5'→3')	Délka
19	TATTCCAAGTTCTTTTATTTTGTGCTG	AAATTTCTTAGCATTGAAGGCAAG	259
20	TATTGCTCAGTTATGTTTCACGTA	GATTATATTGACCACATAGGGC	332

TABULKA 2 NALEZENÉ MUTACE V GENU ATP7A

Pacient	Exon	Změna nukleotidu	Změna aminokyseliny	Důsledek
MD1	19	GAA → TAA	E1249X	zkrácení proteinu
MD2	20	CAA → TAA	Q1288X	zkrácení proteinu



OBR. 2. SCHÉMA PROTEINU ATP7A S NALEZENÝMI MUTACEMI

Výsledky

U dvou vyšetřených nemocných s Menkesovým syndromem byly nalezeny mutace v genu AP7A (Tab. 2.) Obě mutace zřejmě vedou k předčasnému ukončení proteinu a ztrátě jeho funkce (Obr. 2.).

Diskuse

Stanovení správné diagnózy je u Menkesovy choroby nezbytné pro zahájení léčby již v novorozeneckém nebo časném kojeneckém věku, což má zásadní význam pro předcházení vážným poruchám nervového systému a mentálního vývoje. Menkesův syndrom nemusí vždy být jednoznačně rozpoznatelný podle výsledků biochemických vyšetření, jako je hladina mědi a ceruloplasminu v krvi, které jsou u novorozenců vždy vysoké. Řešení nabízí molekulárně genetická analýza genu ATP7A. Dosud bylo v genu ATP7A u nemocných s Menkesovým syndromem popsáno více než 130 mutací. U dvou námi vyšetřených nemocných s Menkesovým syndromem jsme našli dvě odlišné nonsense mutace (Tab. 2.). Mutace E1249X dosud nebyla popsána.

Molekulárně genetická analýza mutací genu ATP7A by měla pomoci potvrdit klinické a biochemické příznaky u pacientů s Menkesovým syndromem a zajistit přesnou diagnostiku této choroby, která zřejmě uniká pozornosti. Uvedená zjištění jsou zvláště důležitá pro genetické poradenství v postižených rodinách.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem MSM 0021620806.

Literatura

- Gu, Y.H.; Kodama, H.; Murata, Y.; Mochizuki, D.; Yanagawa, Y.; Ushijima, H.; Shiba, T.; Lee, C.C.: ATP7A gene mutations in 16 patients with Menkes disease and a patient with occipital horn syndrome. *Am J Med Genet.* 99: 217-22, 2001.
- Hahn, S.; Cho, K.; Ryu, K.; Kim, J.; Pai, K.; Kim, M.; Park, H.; Yoo, O.: Identification of four novel mutations in classical Menkes disease and successful prenatal DNA diagnosis. *Mol Genet Metab.* 73: 86-90, 2001.
- Seidel, J.; Moller, L.B.; Mentzel, H.J.; Kauf, E.; Vogt, S.; Patzer, S.; Wollina, U.; Zintl, F.; Horn, N.: Disrupted copper transport in humans. Part 1: mutations of the ATP7A gene lead to Menkes disease and occipital horn syndrom. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47 Online Pub: OL 141-148, 2001.
- Tumer, Z.; Lund, C.; Tolshave, J.; Vural, B.; Tonnensen, T.; Horn, N.: Identification of point mutations in 41 unrelated patients with Menkes disease. *Am J Hum Genet* 60: 63-71, 1997.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY



VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ přednášky

- 1. místo:** **Mgr. Brožová Eva, 7. r.**
Školitel: MUDr. Kostrouchová Marie, CSc.
Název práce: The expression and function of Caenorhabditis elegans nuclear hormone receptor 40
- 2. místo** **Mgr. Drdová Blanka, 6. r.**
Školitel: MUDr. Vachtenheim Jiří, CSc.
Název práce: Úloha p21/WAF1 při cAMP-dependentní diferenciaci F9 buněk embryonálního karcinomu na parietální endoderm
- 3. místo** **MUDr. Bušek Petr, 1. r.**
Školitel: prof. MUDr. Šedo Aleksi, DrSc.
Název práce: Regulated overexpression of dipeptidyl peptidase – IV and its growth inhibitory effect in human glioma cells



1. místo

**THE EXPRESSION AND FUNCTION OF
CAENORHABDITIS ELEGANS NUCLEAR
HORMONE RECEPTOR 40**

Authors: Eva Brožová, Kateřina Šimečková, Zdeněk Kostrouch,
Marta Kostrouchová

Advisors: MUDr. Marta Kostrouchová, CSc, Laboratory of Molecular Biology and
Genetics, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of
Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic



Eva Brožová

C. elegans nuclear hormone receptors (NHRs) that are distantly homologous to vertebrate retinoid receptors may be divided according to their region directly involved in the contact with DNA, the P box. We are studying NHRs that are characterized by the P box sequence CNGCKT. NHR-40 belongs to the subgroup that has 9 amino acid residues in the inner part of the second zinc finger, similar to mammalian retinoid receptors.

The expression of *nhr-40*, detected by RT PCR, starts in embryos and continues during larval stages. There are at least 3 isoforms of NHR-40 due to differential splicing and the use of at least two promoters that we have begun to characterize. Transgenic lines carrying a GFP reporter gene controlled by either promoter showed expression in muscles and neuronal cells. A truncated region of the first promoter leads to expression in neurons while the second promoter additionally drives expression of *nhr-40::GFP* in ventral and dorsal nerve cords, utse and uv1, 2 and 3 cells. The function of NHR-40 was studied by RNA interference, by induction of expression of mutated constructs in transgenic animals and using a *nhr-40* deletion strain kindly provided by The *C. elegans* Gene Knockout Consortium. The *nhr-40* loss-of-function phenotype revealed a role during late embryogenesis and in the L1 stage.

2. místo

ÚLOHA P21/WAF1 PŘI cAMP-DEPENDENTNÍ DIFERENCIACI F9 BUNĚK EMBRYONÁLNÍHO KARCINOMU NA PARIETÁLNÍ ENDODERM

Autor: Blanka Drdová
Školitel: MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc., Laboratoř molekulární biologie, FN Bulovka



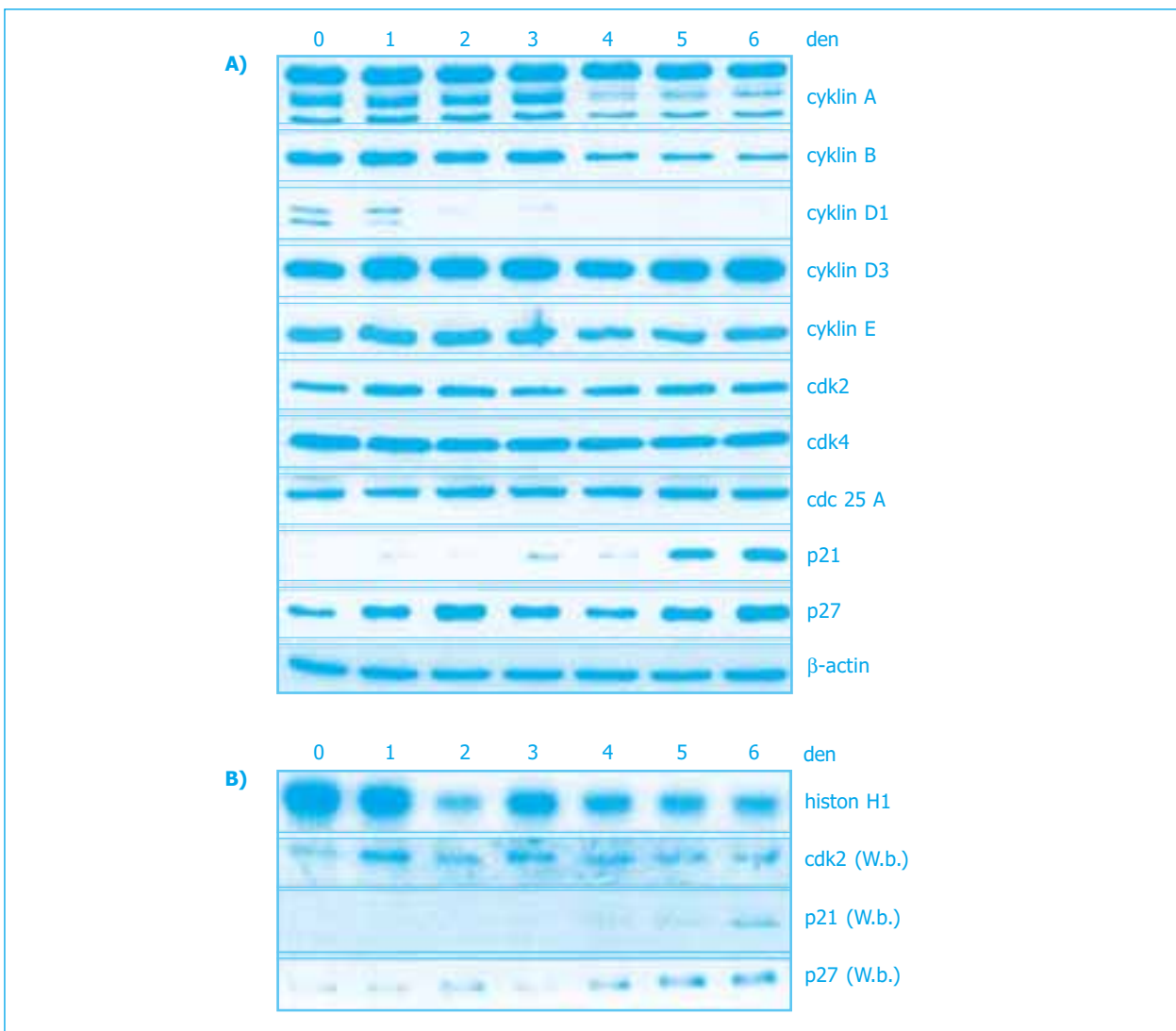
Blanka Drdová

Zkratky:

Cdk = cyklin-dependentní kináza, RA = kyselina retinová, db cAMP = dibutyryl cyklický adenosin monofosfát

Úvod

Protein p21/WAF1 (p21) je multifunkční protein, který má zásadní význam zejména při zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Hraje úlohu také při inhibici apoptózy a má často zvýšenou hladinu při senescenci a diferenciaci některých typů buněk.



OBR. 1 (A) HLADINY PROTEINŮ, KTERÉ SE ÚČASTNÍ BUNĚČNÉHO CYKLU BĚHEM DIFERENCIACE. (B) H1 KINÁZOVÁ AKTIVITA KOMPLEXŮ CYKLIN E-CDK2 A HLADINY PROTEINŮ NĚKTERÝCH SLOŽEK KINÁZOVÉHO KOMPLEXU.

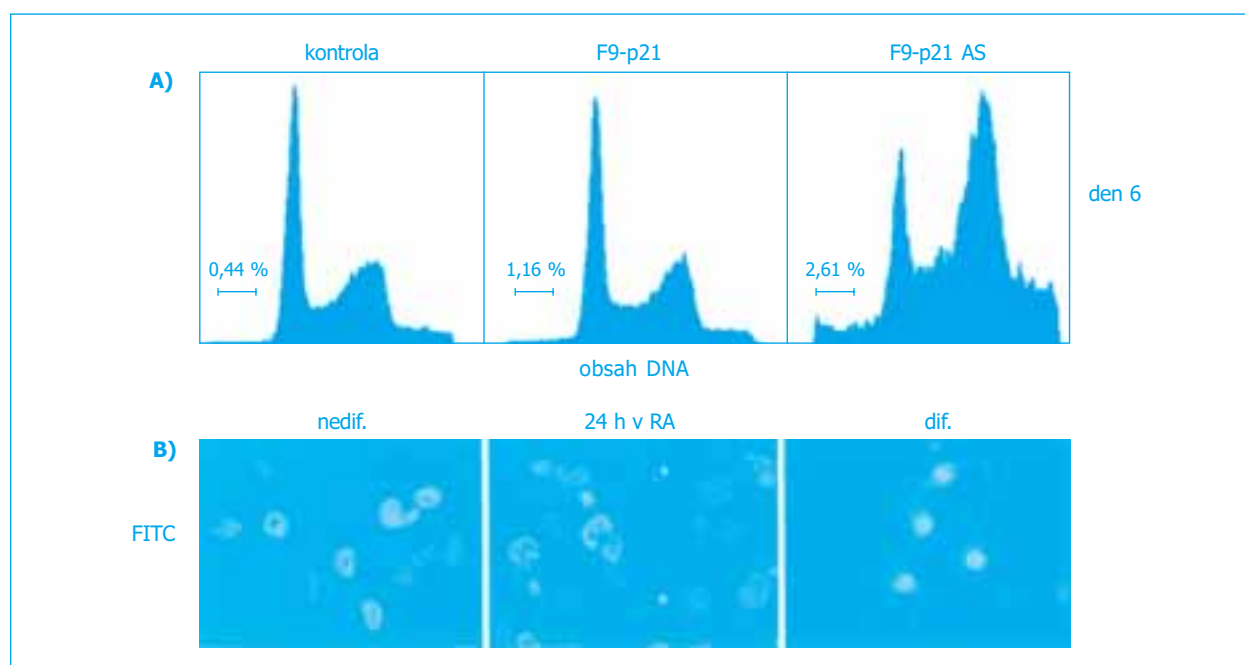
F9 buňky myšího embryonálního karcinomu se vyznačují vysokou proliferační rychlostí a schopností diferencovat do několika buněčných typů. Klíčovou úlohu v jejich diferenciaci má kyselina retinová, která indukuje buňky k diferenciaci na buňky podobnému primitivnímu endodermu. Za současného působení kyseliny retinové a stimulace cAMP signální dráhy jsou buňky diferencovány na parietální entoderm (Strickland et al., 1980). Jejich diferenciaci je doprovázena sníženou proliferační rychlostí, morfologickými změnami a expresí markerů. Zajímalo nás, jakou roli hraje protein p21 v diferenciaci F9 buněk na parietální endoderm.

Výsledky

Při diferenciaci F9 buněk myšího embryonálního karcinomu na parietální entoderm, jsme zjistili, že z proteinů, které se účastní buněčného cyklu, vykazuje nejvýraznější změnu cyklin dependentní kinázový inhibitor p21 (Obr. 1A). K jeho akumulaci v diferencovaných buňkách přispívá zvýšení hladiny jeho mRNA i stabilizace proteinu. Během diferenciaci se snižuje kinázová aktivita komplexů cyklinE-cdk2 a postupně narůstá hladina p21 v těchto komplexech (Obr. 1B).

K určení významu vysoké hladiny proteinu při diferenciaci byly získány klony F9 buněk ektopicky exprimující vysokou hladinu p21 už v nediferencovaném stavu. U nich však nebyly detekovány makery typické pro diferencované buňky, takže sám protein diferenciaci nenavozuje ani neurychluje. Profil buněčného cyklu z průtokové cytometrie těchto nediferencovaných klonů se od kontrolních F9 buněk liší jen lehce zvýšeným počtem buněk v G2 fázi.

Byl také získán klon s ektopicky exprimovanou antisepse p21 cDNA, který měl v diferencovaném stavu sníženou hladinu endogenního proteinu. Jeho profil buněčného cyklu se liší od kontrolních F9 buněk tím, že největší frakce buněk se nachází ve fázi G2/M a objevila se i větší subG1 fáze indikující větší frakci apoptických buněk na konci diferenciaci (Obr. 2A).



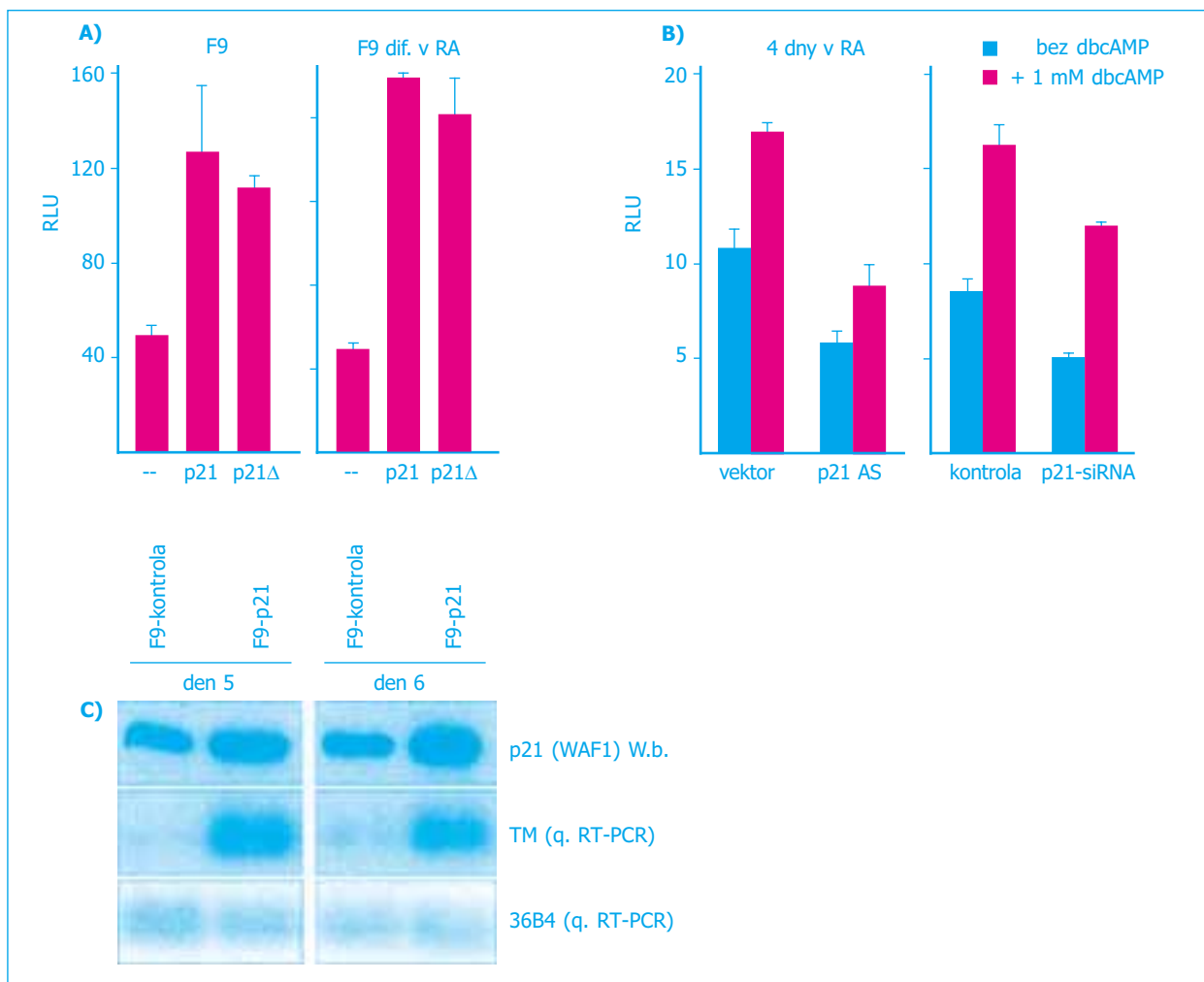
OBR. 2 (A) PROFILY BUNĚČNÝCH CYKLŮ, (B) BUNĚČNÁ LOKALIZACE P21

V souvislosti s rostoucí hladinou p21 během diferenciaci byla sledována také jeho buněčná lokalizace. Zatímco v nediferencovaných buňkách, které se vyznačují vysokou proliferací, byl p21 lokalizován jen v jádře, u diferencovaných buněk dochází k částečné relokaci do cytoplazmy (Obr. 2B). S tímto kompartmentem je asociovaná jeho známá antiapoptická funkce (Sužuji et al., 2000).

Pro diferenciaci F9 buněk na parietální entoderm je charakteristická exprese trombomodulinu (Weiler-Guettler et al., 1992). Proto byl v reporterových studiích sledován vliv p21 na expresi tohoto expresi specifického markeru. Transfekce exogenního p21 aktivovala trombomodulinový promotor-reportér v nediferencovaných i diferencovaných F9 buňkách (Obr. 3A). Naopak, pokud došlo k potlačení exprese endogenního p21 transfekcí p21 antisense konstruktů nebo p21-si RNA v diferencujících se F9 buňkách, snížila se i aktivita trombomodulinového promotoru-reportéru (Obr. 3B).

Zjistili jsme i vliv p21 na zvýšení exprese endogenního trombomodulinu. Klon s vysokou exogenní expresí p21 byl diferencován nejprve pouze v přítomnosti RA (4 dny) a poté indukován přidáním db cAMP k diferenciaci na parietální entoderm. Pomocí RT-PCR byla zjištěna vysoká exprese endogenního trombomodulinu v porovnání s kontrolními F9 buňkami (Obr. 3C).

Transfekce p21 také zvyšovala aktivitu konstruktů GAL-p300 (1-1303), který byl testovaný s trombomodulinovým promotorem s vazebnými GAL místy (Obr. 4). To naznačuje, že p21 může působit na transkripci přes derepresi p300 N-terminální represorové domény a zvyšovat tak funkci p300 koaktivátoru (Snowden et al., 2000; Girdwood et al., 2003).



OBR. 3 (A) KOTRANSFEKCE P21 EXPRESNÍHO VEKTORU STIMULUJE AKTIVITU TROMBOMODULINOVÉHO PROMOTORU-REPORTÉRU. (B) SNÍŽENÍ HLADINY ENDOGENNÍHO P21 SNÍŽUJE AKTIVITU TROMBOMODULINOVÉHO PROMOTORU-REPORTÉRU. (C) ZVÝŠENÍ HLADINY P21 U KLONU S EKTOPICKY EXPRIMOVANÝM P21 JE DOPROVÁŽENO ZVÝŠENOU EXPESÍ THROMBOMODULINOVÉ MRNA.

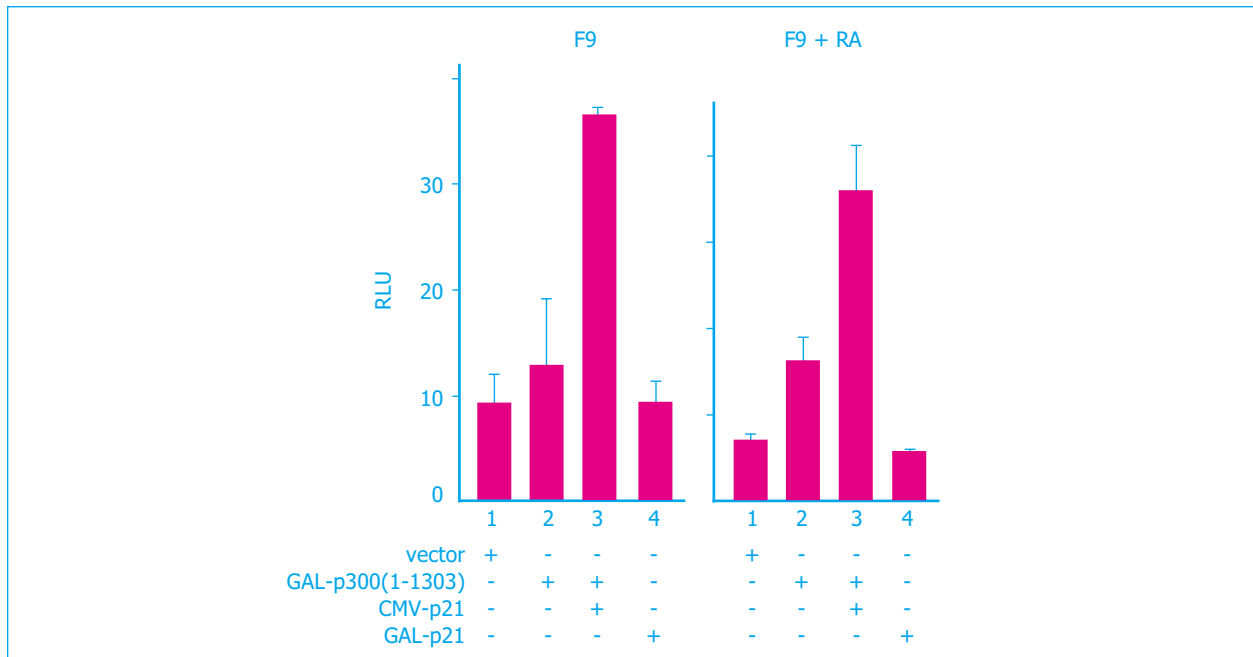
Závěr

Protein p21 má jako inhibitor cyklin dependentních mináž zásadní význam při regulaci buněčného cyklu, zejména při zastavení buněk v G1 fázi (Dotto, 2000). S jeho rostoucí hladinou během diferenciaci F9 buněk na PE se zvyšuje i zastoupení v komplexech cyklin-cdk a přispívá k inhibici kinázové aktivity těchto komplexů.

Výsledky také naznačují pozitivní úlohu p21 při transkripci markerů diferenciaci. Vysoká hladina proteinu p21 sama o sobě diferenciaci nenavozuje, ani neurychluje. Rozhodující je vliv diferenciacních induktorů RA a db cAMP. P21 však ovlivňuje expresi trombomodulinu, diferenciacního markeru, jak bylo prokázáno v reportérových studiích s konstruktem trombomodulinového promotoru a také v pokusu, kde po stimulaci cAMP signální cesty v buňkách, které byly diferencovány pouze v RA a měly vysokou hladinu p21, došlo k masivní transkripci trombomodulinu. Tato indukce navíc potvrzuje úlohu trombomodulinu jako specifického markeru parietální diferenciaci.

Způsob jakým p21 ovlivňuje transkripci diferenciacního markeru pravděpodobně souvisí se schopností p21 aktivovat transkripční koaktivátor p300/CBP derepresí jeho represorové domény CRDI1 (snowden et al., 2000). Tento represivní mechanismus dále vyžaduje vazbu SUMO a histon-deacetylázy 6 na represorovou doménu, což vede ke snížení aktivity transkripčního koaktivátoru p300/CBP (Girdwood et al., 2003). Testování konstruktu trombomodulinového promotoru-reportéru s exogenním p300 a p21 potvrdilo schopnost p21 ovlivňovat aktivitu reportérového konstruktu tímto mechanismem v F9 buňkách.

P21 je také známý svou antiapoptickou funkcí, která je asociovaná s jeho relokalizací do cytoplazmy. p21 je účinný inhibitor prokaspazyv3, která se účastní Fas-zprostředkované buněčné smrti. Fosforylovaný p21 vstupuje na mitochondriích do komplexu s prokaspázou 3 a maskuje místo na jejím NH2 konci, které by štěpily cytoplazmatické serin proteinazy za vzniku aktivované kaspázy 3. (Sužuji et al., 2000). S postupující diferenciací F9 buněk na parietální entoderm, je p21 částečně relokalizován do cytoplazmy. Klon F9 buněk, kde byla potlačena endogenní hladina p21 vykazoval v profilu



OBR. 4 KOTRANSFEKCE P300 A P21 EXPRESNÍCH VEKTORŮ AKTIVUJE TROMBOMODULINOVÝ PROMOTER-REPORTÉR.

buněčného cyklu větší sub G1 fázi indukující větší frakci apoetických buněk na konci diferenciaci. Tento je může být spojený s možnou antiapoptickou úlohou p21 během diferenciaci.

Zjištěné výsledky ukazují, že protein p21 hraje zásadní roli v diferenciaci F9 buněk na parietální endoderm. V souladu s funkcí inhibitoru cdk se podílí na zastavování buněčného cyklu a snížení proliferační rychlosti diferencovaných buněk, účastní se regulace cAMP-zprostředkované transkripce a pravděpodobně brání spuštění apoptózy.

Výsledky této práce byly publikovány:

Drdova, B. and Vachtenheim, J., »A role for p21 (WAF1) in the cAMP-dependent differentiation of F9 teratocarcinoma cells into parietal endoderm,« *Exp. Cell Res.*, Vol. 304, 2005, pp. 293-304.

References

- Dotto, G. P. (2000). P21 (WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim. Biophys. Acta* 1471, M43-M56.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thein, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perlina, N. D., Hay, R. T., (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol. Cell* 11, 1043-1054.
- Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., Perlina, N. D., (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21 (WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol. Cell Biol.* 20, 2676-2686.
- Strickland, S., Smith, K. K., Marotti, K. R., (1980). Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyl cAMP. *Cell* 21, 347-355.
- Sužuij, A., Kawano, H., Hayashida, m., Hayasaki, Y., Tsuomi, Y., Kahane, K., (2000). Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase a. *Cell Death. Digger.* 7, 721-728.
- Weiler-Guettler, H., Yu, Soff, G., Gudas, L. J., Rosenberg, R. D., (1992). Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2155-2159.

3. místo

REGULATED OVEREXPRESSION OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE-IV AND ITS GROWTH INHIBITORY EFFECT IN HUMAN GLIOMA CELLS

Autoři: Petr Bušek (1. ročník), Evžen Křepela, Vladislav Mareš, Květoslava Vlačicová, Jan Ševčík a Aleksi Šedo

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



Petr Bušek

Introduction

Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) is a serine-type peptidase cleaving N-terminal X-Pro dipeptides from a number of substrates. It is a type II transmembrane protein consisting of a short cytoplasmic N-terminal, a transmembrane segment, and an extracellular domain containing the catalytic region. In native conditions, DPP-IV forms homodimers via both the b-propeller and catalytic domain with a molecular weight of about 240 000. Moreover, heterodimers with FAP-a have been observed in fibroblasts and melanocytes. DPP-IV is widely expressed throughout the body, although with differing intensity (Lambeir *et al* 2003).

Numerous biologically active peptides, systemic as well as local hormones, contain an evolutionary conserved proline residue as a proteolytic-processing regulatory element (Vanhoof *et al* 1995). Limited proteolysis of multiple neuropeptides, chemokines, incretins etc. by dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity (De Meester *et al* 2000) leads to both quantitative and in some cases due to the diversification of their receptor preference, also qualitative changes of their signaling potential (Busek *et al* 2004). Such hydrolytic activity was originally recognized as "canonical" DPP-IV/CD26 (EC 3.4.14.5). Work over the past years has demonstrated that DPP-IV has a multitude of physiological roles (Lambeir *et al* 2003). Although the greatest part of systemic DPP-IV activity probably resides in DPP-IV/CD26, further studies demonstrated that a significant amount of DPP-IV activity can be attributed to a growing panel of other proteins, including Fibroblast-activation protein a/Seprase (FAP), Quiescent cell proline dipeptidase (QPP/DPP-II/DPP-7), DPP8, DPP9 and Attractin. Moreover, several additional molecules devoid of the characteristic enzymatic activity, but possessing high degree of structural similarity to DPP-IV, for example DPP6 and 10, were included among DASH molecules too (Sedo and Malik, 2001). So far, DPP-IV, FAP and DPP-II/QPP have been shown to participate on the regulation of multiple important cellular programs, including cell growth, transformation, apoptosis, invasion and tumor metastasis. In contrast to proteases involved in cancer development and progression as the executors of tissue degradation, most DASH operate as regulatory molecules, modifying biologically active peptides.

Material and methods

The full-length cDNA of human DPP-IV/CD 26 (a generous gift from prof. W-T. Chen, SUNY, USA) was subcloned into the pGene vector of the Mifepristone inducible Gene Switch system (Invitrogen). DPP-IV negative T98G cells (ATCC, Middlesex UK) were transfected using Lipofectamine reagent and stable clones were selected with Zeocin and Hygromycin. Resulting clones exhibited low, but measurable DPP-IV-like enzymatic activity and detectable DPP-IV mRNA expression, even without Mifepristone stimulation. Such „leakage” transcription is an inherent property of the Gene Switch system (manufacturer's manual).

Inducible expression of DPP-IV mRNA was confirmed by real time RT-PCR (Figure 1A) using ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cell surface DPP-IV-like enzymatic activity in suspensions of viable cells (Figure 1B) was assessed by continuous rate fluorimetric assay (Spectrofluorimeter Beckman L50B) using 7-(glycyl-prolylamido)-4-methylcoumarin (Bachem) as a substrate (Sedo *et al* 1989). The inducible expression of DPP-IV protein was further confirmed by immunohistochemistry (not shown).

For growth curve determination, 40 000 cells per well were seeded in a 24 well plate in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, harvested daily in triplicate and counted on Coulter Counter Z2 (Beckman). For cocultivation experiments, a mixture 1:1 of transfected and untransfected cells was seeded.

Expression of transcript of NK1, the preferential substance P receptor, was assessed according to standard RT-PCR protocols (Dyad engine, MJ Research) optimized for the purpose in our laboratory. The specificity of the PCR products was confirmed by sequencing (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) using the same PCR primers.

Results**Co-expression of DASH molecules**

As shown in Figure 1A, robust upregulation of DPP-IV mRNA in Mifepristone stimulated transfectants was associated with about a hundred-fold DPP-IV activity enhancement (Figure 1B). In compliance with the previous reports (Wesley *et al* 1999), DPP-IV transfected T98G cells exhibited higher FAP expression than the parental wild cells (not shown). The expression of FAP however declined during the course of Mifepristone-induced DPP-IV activity upregulation, while there was only a slight change of Attractin expression (Figure 1A).

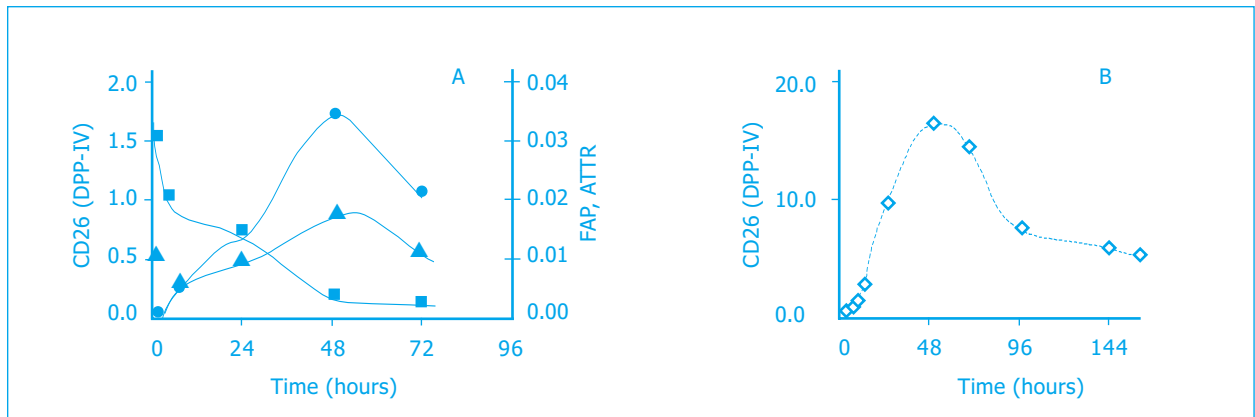


FIGURE 1. (A) QUANTITATIVE ANALYSIS OF DASH TRANSCRIPTS EXPRESSION NORMALIZED TO HUMAN β ACTIN MRNA (Δ CT). CIRCLES: DPP-IV, SQUARES: FAP, TRIANGLES: ATTRACTIN (ATTR). (B) CELL SURFACE DPP-IV-LIKE ENZYMATIC ACTIVITY. TIME 0: INDUCTION OF DPP-IV EXPRESSION IN TRANSFECTED T98G CELLS WITH MIFEPRISTONE.

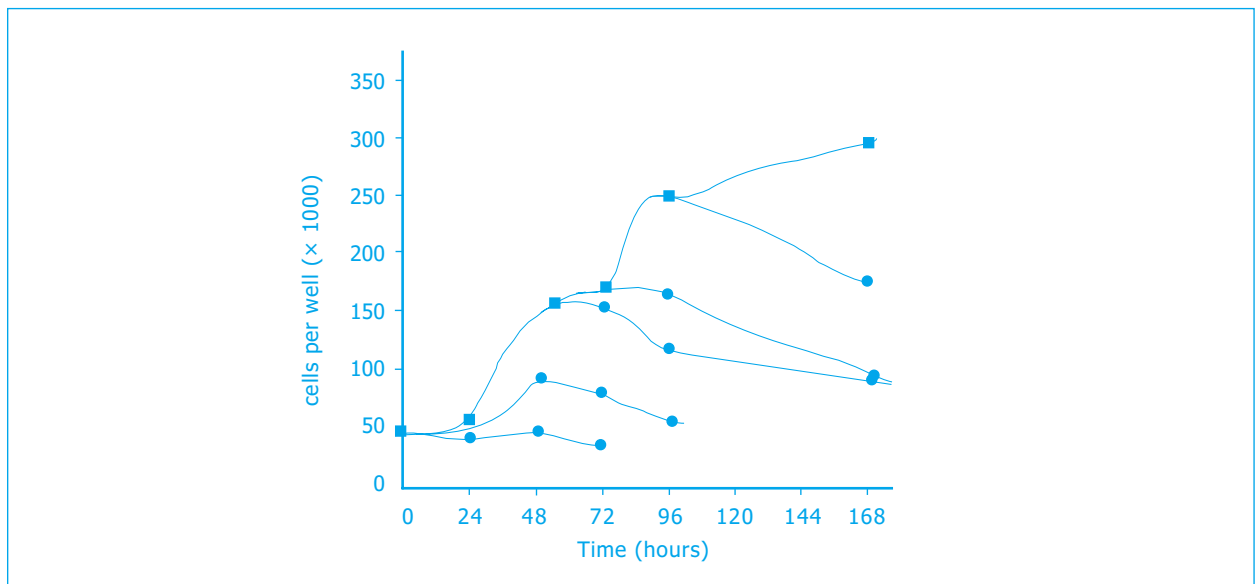


FIGURE 2. GROWTH CURVES OF T98G CELLS WITH INDUCIBLE DPP-IV EXPRESSION. SQUARES: TRANSFECTED CELLS. CIRCLES: TRANSFECTED CELLS UPREGULATING DPP-IV AFTER MIFEPRISTONE INDUCTION AT TIME 0, 24, 48, 72 AND 96 HOURS. MIFEPRISTONE DID NOT AFFECT THE GROWTH OF PARENTAL WILD CELLS (FIGURE 3). DATA EXPRESSED AS A MEAN OF TRIPLICATES.

DPP-IV and cell proliferation

Cell proliferation was substantially reduced in T98G cells upregulating DPP-IV compared to transfected, but unstimulated counterparts (Figure 2). Moreover, growth in the cell culture could be halted in different growth stages with cell numbers actually declining upon DPP-IV upregulation (Figure 2).

The growth arrest could neither be overcome by replacing the media repeatedly nor by cultivation in media with higher serum content (data not shown). Further, the growth of untransfected T98G cells was not affected in cocultivation experiments (Fig 3).

Expression of NK1 receptor

DPP-IV transfected cells markedly expressed NK1 (preferential receptor of substance P) mRNA, following the Mifepristone-induced DPP-IV overexpression. Moreover, the NK1 upregulation was tightly linked to the boost of DPP-IV hydrolytic activity (Figure 4). Immunocytochemical detection confirmed NK1 upregulation observed on transcriptional level (Busek *et al*, unpublished results).

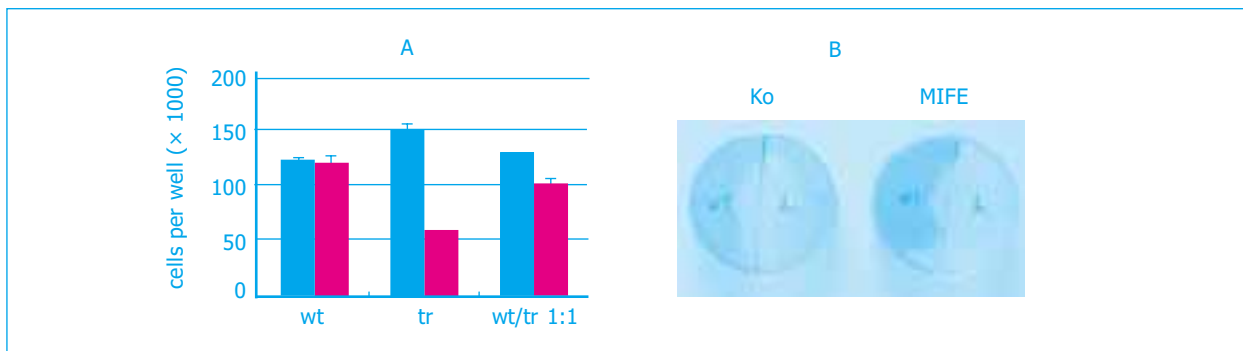


FIGURE 3. THE GROWTH OF UNTRANSFECTED CELLS IS NOT AFFECTED BY DPP-IV EXPRESSING CELLS. (A) DPP-IV TRANSFECTED (TR), UNTRANSFECTED WILD TYPE (WT) CELLS OR A MIXTURE OF WT AND TR WERE SEEDING AND GROWN FOR 48 HOURS WITH (BLUE BOXES) OR WITHOUT (BLACK BOXES) THE ADDITION OF MIFEPRISTONE. THE DECREASE OF CELL NUMBER IN WT/TR 1:1 MIXTURE IS EVEN LOWER THAN EXPECTED FROM THE GROWTH ARREST OBSERVED IN TRANSFECTED CELLS. DATA EXPRESSED AS A MEAN OF TRIPPLICATES. (B) WT AND TR CELLS WERE SEEDING AS SEPARATE DROPS IN OPPOSITE SIDES OF CULTURE DISH AND ALLOWED TO ATTACH. THE MEDIA WERE THEN REPLACED AND CELLS WERE GROWN WITH (MIFE) OR WITHOUT (KO) THE ADDITION OF MIFEPRISTONE. CULTURE DISHES WERE PHOTOGRAPHED AFTER 144 HOURS AFTER FIXING AND STAINING THE CELLS WITH METHYLEN BLUE. THE GROWTH OF WT CELLS IS NOT AFFECTED WHILE ONLY REMNANTS OF TRANSFECTED CELLS ARE PRESENT AFTER ADDITION OF MIFEPRISTONE.

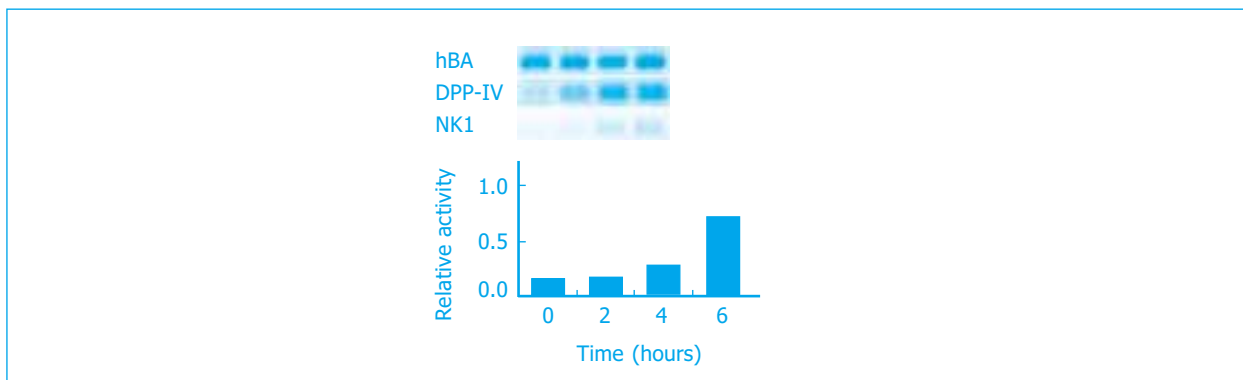


FIGURE 4. RELATIONSHIP OF DPP-IV AND NK1 MRNA EXPRESSION AND DPP-IV ENZYMATIC ACTIVITY UPREGULATION IN TRANSFECTED T98G CELLS. TIME 0: INDUCTION OF DPP-IV EXPRESSION WITH MIFEPRISTONE. HBA: HUMAN β -ACTIN

Discussion

An antioncogenic effect of DPP-IV was demonstrated by experimentally induced expression in cell lines derived from melanoma (Wesley *et al* 1999), ovarian carcinoma (Kajiyama *et al* 2002, 2003), non-small cell lung carcinoma (Wesley *et al* 2004) and lately prostatic carcinoma (Wesley *et al* 2005). DPP-IV upregulation was accompanied by decreased tumorigenicity and invasive potential, anchorage independent growth, changed cell morphology and growth properties, and increased apoptosis. These complex phenotype changes were possibly due to concomitantly changed expression of adhesion molecules, growth factors, and ECM degrading proteases as well as to the increased degradation of local mediators (Wesley *et al* 1999, 2004, 2005; Kajiyama *et al* 2003).

In our model, the growth of cells expressing DPP-IV is substantially decreased. This is accompanied by downregulation of FAP, a plasma membrane protein with DPP-IV-like enzymatic activity, which may hypothetically represent cell reaction to the excessive DPP-IV-like activity. Moreover, NK1 upregulation could be interpreted as a compensatory facilitation of substance P signaling under conditions of its relative deficiency due to its augmented DPP-IV-mediated degradation. NK1 ligand substance P has a proven proliferation-promoting effect in glioma cells (Palma and Maggi 2000). The growth of wild type cells was unaffected in cocultivation experiments suggesting that DPP-IV acts rather on a single cell level.



Conclusions

Experimentally induced expression of DPP-IV in T98G glioma cell line is accompanied by growth arrest that could be due to decreased proliferation or survival of the cells. The effect of DPP-IV seems to be restricted to the cell expressing the enzyme as demonstrated by the cocultivation experiments.

The observed changes of FAP expression associated with experimentally induced DPP-IV upregulation may suggest functional and/or regulatory relationships within the DASH group. Moreover, concomitant modulation of NK1, receptor of biologically active DPP-IV substrate, support existence of hypothetical integral and cooperating „DASH system” (Busek *et al* 2004), involving DASH, their substrates and corresponding receptors.

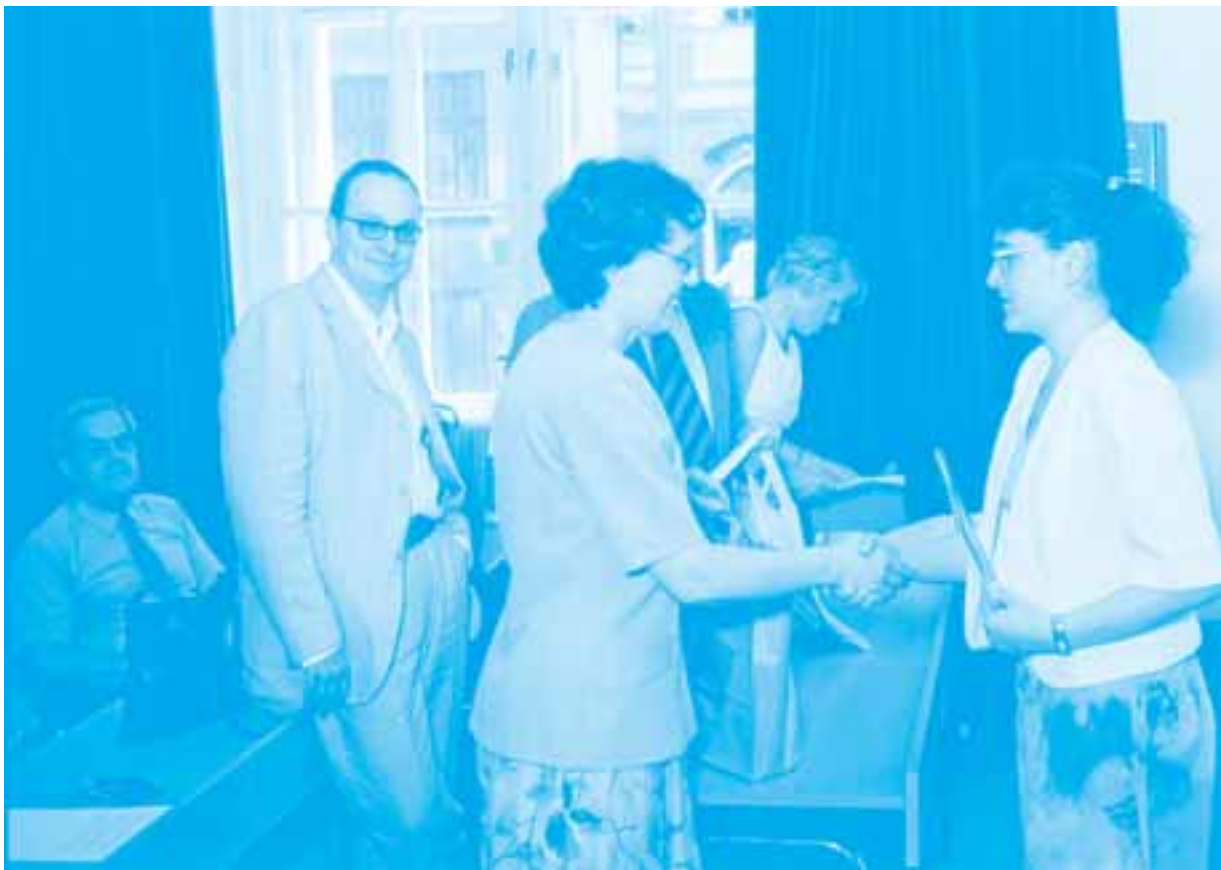
Acknowledgements

This work was supported by grant MSM 0021620808 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

We are indebted to professor W-T. Chen, State University of New York, USA, for a kind gift of DPP-IV clones, Cyril Barinka and Jan Konvalinka, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, for the construction of the vector.

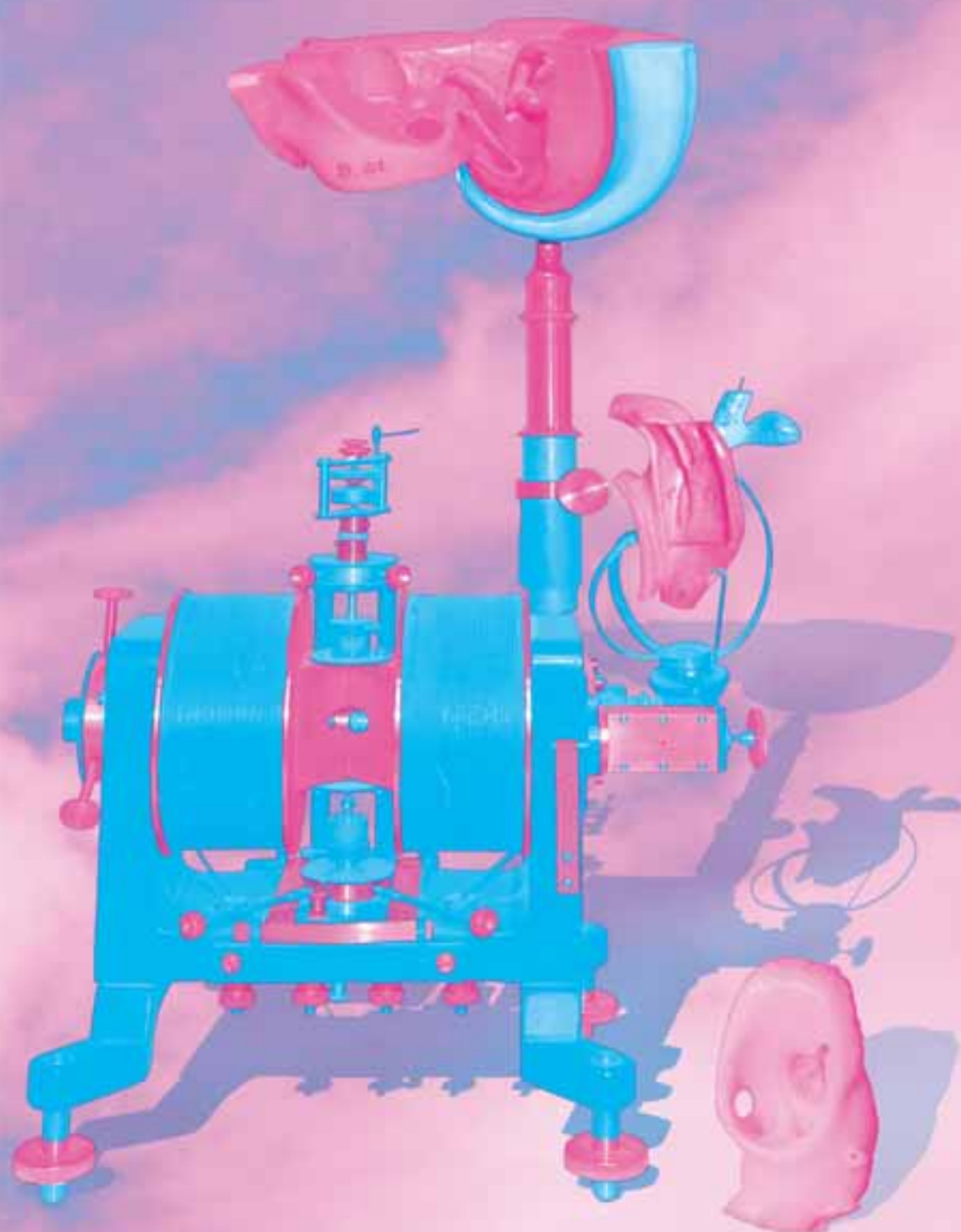
References

- Busek P, Malik R, Sedo A, 2004, Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**: 408-421.
- De Meester I, Durinx C, Bal G, Proost P, Struyf S, Goossens F, Augustyns K, Scharpe S, 2000, Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. *Adv Exp Med Biol.* **477**: 67-87.
- Kajiyama H, Kikkawa F, Suzuki T, Shibata K, Ino K, Mizutani S, 2002, Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **62**: 2753-2757.
- Kajiyama H, Kikkawa F, Khin E, Shibata K, Ino K, Mizutani S, 2003, Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* **63**: 2278-2283.
- Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I, 2003, Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **40**: 209-94.
- Palma C, Maggi CA, 2000, The role of tachykinins via NK1 receptors in progression of human gliomas. *Life Sci.* **67**: 985-1001.
- Sedo A, Krepela E, Kasafirek E, 1989, A kinetic fluorometric assay of dipeptidyl peptidase IV in viable human blood mononuclear cells. *Biochimie* **71**: 757-761.
- Sedo A, Malik R, 2001, Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta* **1550**: 107-116.
- Vanhoof G, Goossens F, De Meester I, Hendriks D, Scharpe S, 1995, Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **9**: 736-744.
- Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN, 1999, A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med.* **190**: 311-322.
- Wesley UV, Tiwari S, Houghton AN, 2004, Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer* **109**: 855-866.
- Wesley UV, McGroarty M, Homoyouni A, 2005, Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res.* **65**: 1325-1334.



Předávání cen vítězům 6. ročníku studentské vědecké konference na 1. LF UK.

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ POSTERY



VÍTĚZNÉ PRÁCE IN EXTENSO

SEKCE POSTGRADUÁLNÍ postery

- 1. místo:** **Ing. Broučková Adéla, 2. r.**
Školitel: Dr. Ing. Holada Karel
Název práce: The characterization of platelet membrane bound cellular prion protein
- 2. místo** **Mgr. Spišáková Martina, 3. r.**
Školitel: MUDr. Mělková Zora, Ph.D.
Název práce: Caspase activation during vaccinia virus-caused lytic infection
- 3. místo** **MUDr. Kutinová-Canová Nikolina, 5. r.**
Školitel: prof. MUDr. Farghali Hassan, DrSc.
Název práce: Vztah oxidu dusnatého k beta3-adrenergní lipolýze a kaskádě cyklického AMP

1. místo

THE CHARACTERIZATION OF PLATELET MEMBRANE BOUND CELLULAR PRION PROTEIN

Authors: Adéla Broučková, Karel Holada
Advisor: Dr. Ing. Karel Holada, Department of Immunology and Microbiology,
 1st Medical Faculty, Charles University in Prague, Czech Republic



Adéla Broučková

Introduction

The conversion of cellular prion protein (PrP^c) into pathological one (PrP^{sc}) is central event in transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). Various cells including blood elements express PrP^c, consequently it could be involved in transmission of prion diseases by blood. The characterization of PrP^c in cells is essential to know in order to understand both the mechanism of transmission of TSEs and the physiological function of PrP^c.

The aim of the study

The expression of PrP^c on blood platelets has been described by previous study and the existence of intracellular PrP^c was proposed (Holada et al., 1998). The current study is aimed on characterization of PrP^c in platelets concerning anchoring of PrP^c, its incorporation in lipid rafts and the intracellular localization.

Conclusions

1. Platelet PrP^c is bound on membrane via GPI-anchor.
2. Our results suggest the existence of cytosolic pool of platelet PrP^c.
3. The PrP^c present in membranes and cytosol is less sensitive to proteolysis than PrP^c in platelet organelles.
4. Part of platelet PrP^c is incorporated in lipid rafts.

Acknowledgement

This work was supported by IGA MZ 7416-3 and GAČR 31005H533.

Contact: Adela.Brouckova@lf1.cuni.cz

Results

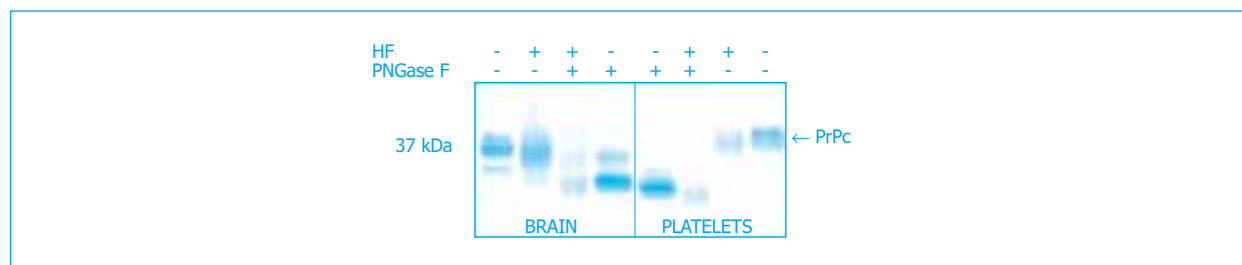


FIG. 1. CLEAVAGE OF GPI-ANCHOR BY AQUEOUS HYDROFLUORIC ACID. PLATELET MEMBRANES WERE PREPARED BY PLATELET DISRUPTION BY SONICATION AND SUBSEQUENT CENTRIFUGATION AT 14 000 G FOR 15 MIN. SUPERNATANT CONTAINS BOTH MEMBRANES AND CYTOSOL. ALIQUOTS TREATED AND NON-TREATED WITH PNGASE F WERE METHANOL PRECIPITATED AND TREATED WITH HF FOR 48 HOURS. PROTEINS WERE RESOLVED BY SDS-PAGE, TRANSFERRED TO NITROCELLULOSE AND VISUALIZED USING MONOCLONAL ANTIBODY 6H4 AND SECONDARY ANTIBODY LABELED WITH ALKALINE PHOSPHATASE. AFTER CLEAVAGE OF GPI-ANCHOR THE MOLECULAR WEIGHT DECREASED.

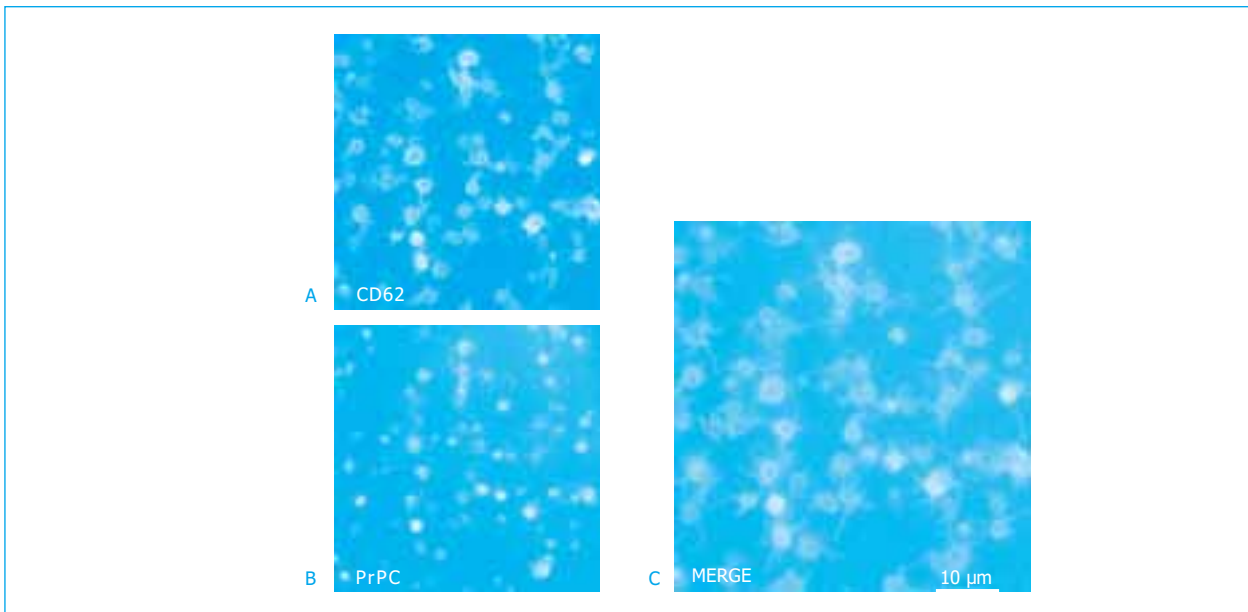


FIG. 2. INTRACELLULAR LOCALIZATION OF PRPC. PLATELETS OBTAINED FROM PRP WERE CYTOSPUEN ONTO POLY-L-LYSINE COATED SLIDES, FIXED WIT 1% PFA AND PERMEABILIZED WITH METHANOL. PRPC WAS LABELED WITH COCKTAIL OF MONOCLONAL ANTIBODIES 6H4 AND 1562 AND GAM-TRITC (A). α -GRANULAR PROTEIN CD62 WAS LABELED WITH POLYCLONAL ANTI-CD62 RABBIT ANTISERUM AND GAR-FITC (B). FIGURE (C) SHOWS THE MERGE OF PRPC AND CD62 FLUORESCENCE.

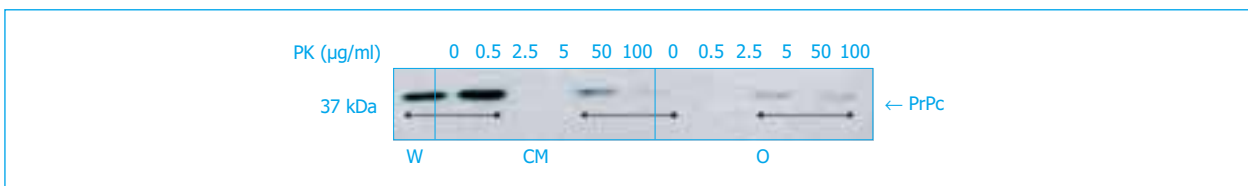


FIG. 3. PRPC SENSITIVITY TO PK TREATMENT. PLATELET FRACTIONS WERE PREPARED BY PLATELET DISRUPTION BY SONICATION AND SUBSEQUENT CENTRIFUGATION AT 14 000 G FOR 15 MIN. THE PELLET CONTAINED ORGANELLES WHEREAS SUPERNATANT CONSISTED FROM MEMBRANES AND CYTOSOL. BOTH FRACTIONS WERE TREATED WITH PK AT 0°C FOR 30 MIN AND THE PROTEOLYSIS WAS STOPPED BY 5 MM PMSF. SAMPLES WERE SEPARATED BY SDS-PAGE, BLOTTED TO NITROCELLULOSE AND PROBED WITH ANTIBODY 6H4. CM FRACTION IS LESS SENSITIVE TO PK TREATMENT. W – WHOLE PLATELETS, CM – CYTOSOL AND MEMBRANES, O – ORGANELLES.

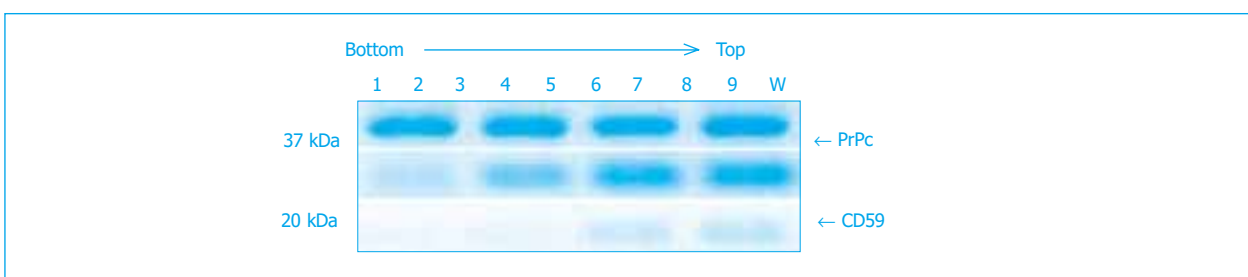


FIG. 4. LOCALIZATION OF PRPC IN LIPID RAFTS. GEL-FILTERED PLATELETS WERE LYSED IN BUFFER CONTAINING 1% IGEPAL CA-360. THE SAMPLES WERE SUBJECTED TO FLOTATION ASSAY ON SUCROSE DENSITY GRADIENT AND THE PROTEINS OF EACH FRACTION WERE SEPARATED BY SDS-PAGE AND IMMUNOBLOTTED WITH MONOCLONAL ANTIBODIES 6H4 AND ANTI-CD59. SECONDARY ANTIBODY WAS LABELED WITH ALKALINE PHOSPHATASE. CD59 IS GPI-ANCHORED PROTEIN, WHICH SERVES AS A MARKER FOR LIPID RAFTS. W – WHOLE PLATELETS.

2. místo

CASPASE ACTIVATION DURING VACCINIA VIRUS-CAUSED LYTIC INFECTION

Authors: Martina Spišáková, Jana Lišková, Marie Kalbáčová and Zora Mělková

Advisor: MUDr. Zora Mělková, Ph.D., Institute of Immunology and Microbiology of the 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic



Martina Spišáková

Introduction

Vaccinia virus (VV), a member of the orthopoxvirus family, causes lysis in most of infected cells, with exception of several immune cells in which VV induces apoptosis. Lytic infection is equivalent of necrotic cell death. Based on our previous results, lytic infection of epithelial cells BSC 40 and HeLa G by VV reveals characteristics of necrosis – increased plasma membrane permeability → positivity in staining with propidium iodide, typical changes in cell morphology, absence of DNA ladder formation. However we observed activation of caspases, a typical hallmark of apoptotic process.

Methods and results

For all experiments were used two different epithelial cell lines – HeLa G (human cervical carcinoma cells) and BSC 40 (African green monkey kidney cells). Firstly we observed caspase activation by three different **flow-cytometric methods**. Used assays characterize caspase activity on three different levels of apoptotic cascade. First method, Caspa Tag™ Fluorescein (VAD) Assay Kit, binds a fluorescein-labeled broad-spectrum caspase inhibitor to active caspases and detects caspase activation. In the second method, Rhodamine 110 bis-(L-aspartic acid amide) is served as a non-fluorescent substrate of caspases that is converted by active caspases into a fluorescent product. Third method, M30 CytoDEATH Kit, detects levels of cleaved cytokeratin 18, product of caspase proteolysis. We detected higher caspase activity in both cell lines infected with VV in comparison to mock-controls by all three used flow-cytometric methods (Fig. 1).

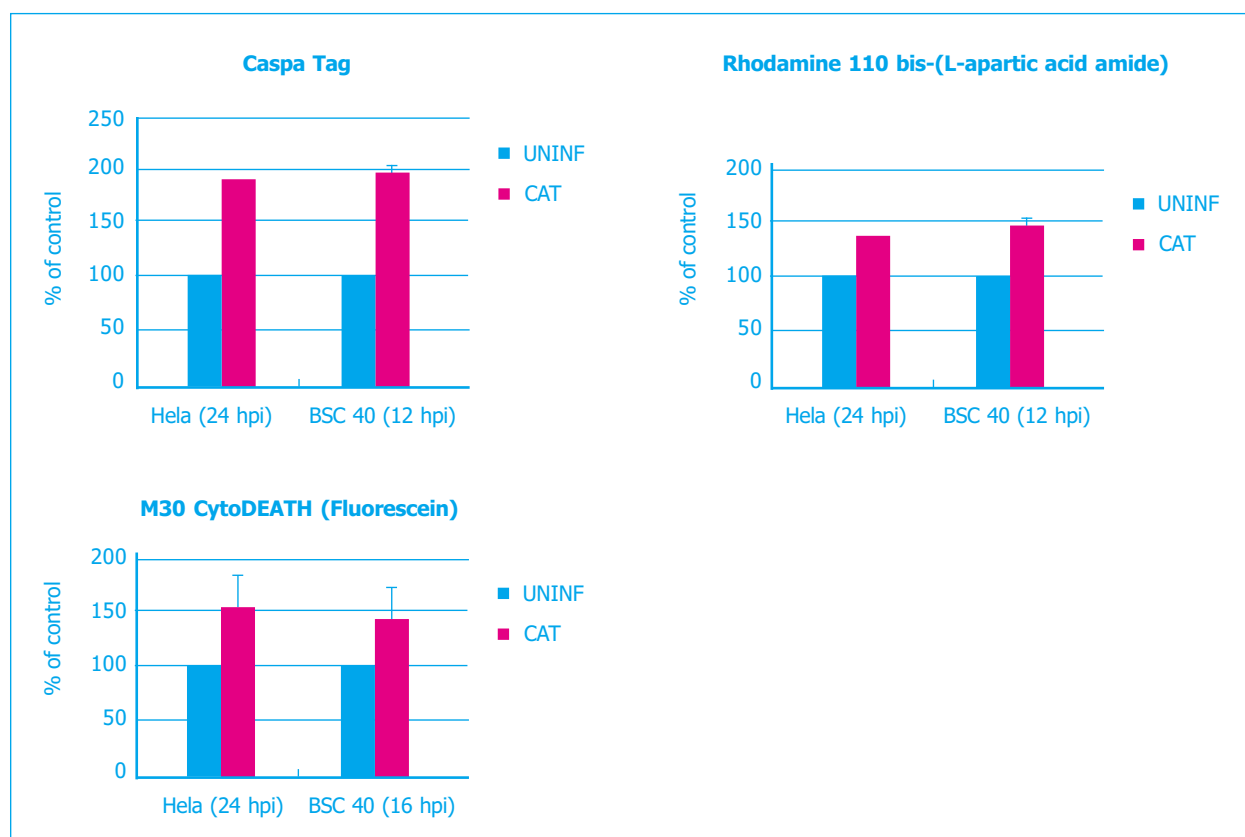


FIGURE 1. INCREASED CASPASE ACTIVITY INDUCED BY VV-INFECTION OBSERVED BY THREE DIFFERENT FLOW CYTOMETRY METHODS.

To further analyze proteolytic processes, we determined cleavage of typical caspase substrates poly(ADP-ribose)polymerase – PARP, cytokeratin 18 and actin by **western blot analysis**. However we have not detected any cleavage of PARP or actin in cells with necrotic morphology using this method. We observed cleavage of cytokeratin 18 during VV-infection by western blot what verify data obtained by M30 CytoDEATH Kit (Fig. 2).

Next step in our experiments was treatment of infected cells with pan-caspase inhibitor z-VAD-FMK and characterization of **changes in VV growth** and PARP proteolysis. Treatment with used caspase inhibitor did not change growth of VV in epithelial cell lines. On the other hand, we saw some inhibition effects on VV growth in macrophages (Fig. 3).

Conclusion

We can consider about few thing which can influence processes during VV infection:

- role of other proteases than caspases
- kinetic of infection – role of inhibitors encoded by VV
- depletion of energy sources → apoptotic process can not come in to the end

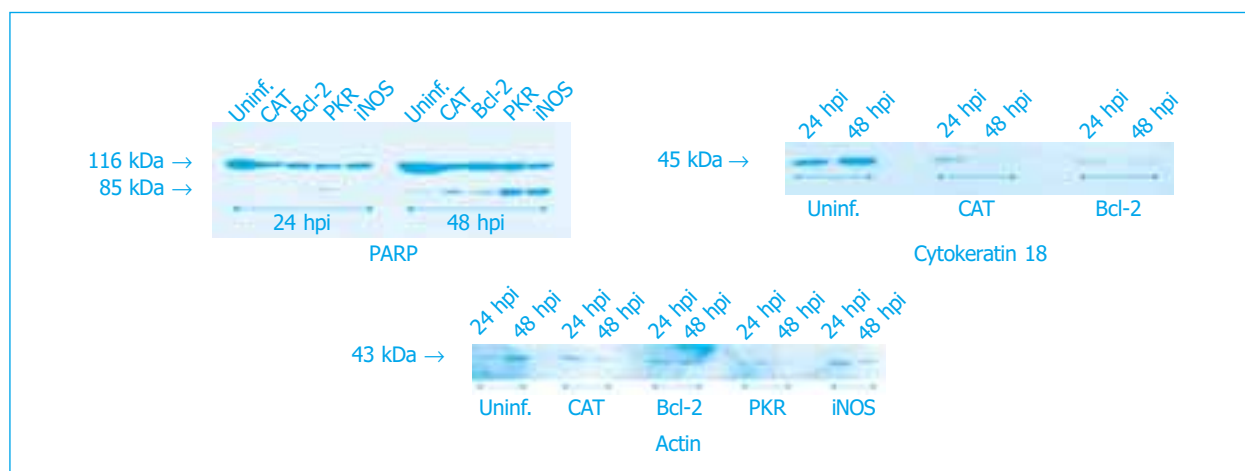


FIGURE 2. WESTERN BLOT ANALYSIS OF PARP, ACTIN AND CYTOKERATIN 18 CLEAVAGE IN HELA CELLS INFECTED WITH VACCINIA VIRUS.

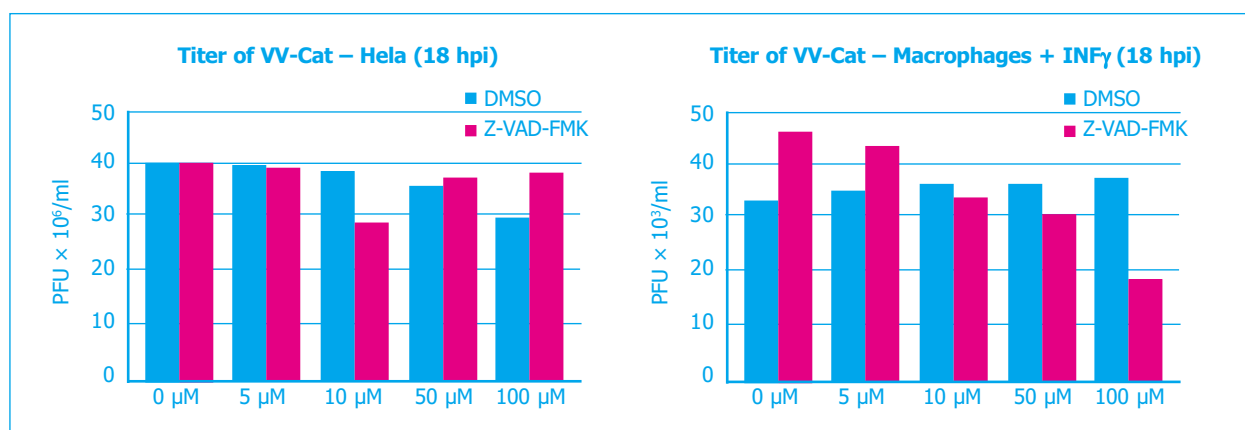


FIGURE 3. CHANGES IN VV GROWTH IN HELA CELLS AND MACROPHAGES AFTER PAN-CASPASE INHIBITOR Z-VAD-FMK TREATMENT.

3. místo

VZTAH OXIDU DUSNATÉHO K BETA₃-ADRENERGNIÍ LIPOLÝZE A KASKÁDĚ CYKlickÉHO AMP

Autor: Nikolina Kutinová-Canová
Školitel: Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc., Farmakologický ústav 1. LF UK



Nicolina
Kutinová-Canová

Úvod a cíle

Na adipocyty jako endokrinně-sekreční buňky udržující energetickou homeostázu organismu a jako nejvýznamnější činitel předurčující metabolické komplikace obezity se v současné době zaměřuje řada výzkumných projektů s cílem nalézt mechanismy, které regulují metabolismus tukové tkáně a které by bylo možné modifikovat farmakologickými zásahy [1–6].

Kromě řady hormonů, růstových faktorů, cytokinů a různých typů receptorů exprimovaných v tukové tkáni a působících endokrinně, parakrinně a/nebo autokrinně, hraje klíčovou roli při stimulaci lipolýzy v tukových buňkách sympatický nervový systém, jehož působení je zprostředkovanou vazbou katecholaminů na β -adrenergní receptory (β_1 , β_2 a β_3 -AR) s následnou aktivací kaskády adenyllycykláza/cyklický adenosin monofosfát (cAMP)/proteinkináza A/hormon senzitivní lipáza, která nakonec štěpí triglyceridy uskladněné v adipocytech na glycerol a volné masné kyseliny (VMK). V několika studiích bylo ukázáno, že mutace genu pro β_3 -AR je u některých subjektů asociována s abdominálním typem obezity a s jejími komplikacemi, a že modifikace funkcí β_3 -AR v bílé tukové tkáni může být zodpovědná za poruchu metabolismu lipidů [7].

Nedávno byla v adipocytech a v lidské tukové tkáni, mezi jinými endogenními mediátory, detekována také molekula oxidu dusnatého (NO) a endoteliální (eNOS) i inducibilní syntáza oxidu dusnatého (iNOS) [8–10]. I když role endogenního NO v tukové tkáni není stále objasněna, předpokládá se, že NO může ovlivňovat metabolismus lipidů v adipocytech.

Proto cílem naší práce bylo objasnit možný vztah mezi produkcí NO a aktivací transdukční cesty β -AR/cAMP vedoucí k lipolýze v bílé tukové tkáni potkanů a to pomocí:

1. stanovení vlivu specifických a nespecifických β -AR agonistů a antagonistů a modulátorů intracelulárního cAMP na lipolýzu a produkci NO v adipocytech;
2. porovnání efektu specifických a nespecifických NOS inhibitorů a NO donorů na lipolýzu indukovanou podáním β_3 -AR agonisty.

Materiál a metody

Izolace a kultivace potkaních adipocytů

Adipocyty byly izolovány ze stříhané epididymální tukové tkáně potkanů kmene Wistar (samci, 220–300 g) standardní kolagenázovou metodou [11] a poté kultivovány v CO₂ inkubátoru (37 °C, 95 % zvlhčeného vzduchu, 5 % CO₂) jako suspence buněk v kompletním „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ s 10% fetálním bovinním sérem po dobu 30, 60, 120, 150 min nebo 24 hodin [12], [13]. Po 3hodinové stabilizaci, byly k primární kultuře adipocytů přidány jednotlivě nebo v kombinacích, které jsou uvedeny níže v sekci „Výsledky“, následující látky:

1. induktory a inhibitory lipolýzy – neselektivní β -AR (isoprenalin, ISO 2 μ M)/selektivní β_3 -AR (BRL-37344, BRL 0,2 μ M) agonista, neselektivní β -AR (propranolol, PRO 20 μ M)/selektivní β_3 -AR (bupranolol, BUP 10 μ M) antagonist, analog cAMP (dibutyryl-cAMP, db-cAMP 1 mM), specifický aktivátor adenyllycyklázy (forskolin 50 μ M), inhibitor fosfodiesterázy (3-isobutyl-1-metylxantin, IBMX 500 μ M) a specifický inhibitor adenyllycyklázy (SQ 22,536, SQ 100 μ M);
2. modulátory signálního systému NO – nespecifický (N^o-nitro-L-arginin-metylester, L-NAME 10 mM)/specifický (aminoguanidin, AG 10 mM) iNOS inhibitor, NO-donor (S-nitroso-N-acetyl-penicillamin, SNAP 250 μ M) a analog cyklického guanosin monofosfátu (8-bromo-cGMP, 8-Br-cGMP 1 mM). Některé z primárních kultur adipocytů byly preinkubovány (preindukovány) s BRL 30 min před podáním BUP, PRO, SQ, L-NAME, AG nebo SNAP.

Biochemická analýza

Produkce NO a úroveň lipolýzy byly stanoveny pomocí spektrofotometrických biochemických metod vždy na konci inkubace adipocytů, kdy byly odebrány vzorky kultivačního média ke stanovení hladin NO₂⁻, glycerolu a VMK. Nitrity jako konečné stabilní produkty NO byly v médiu detekovány Griesseovým činidlem (1% sulfanylamid, 0,1% naftyletylendiamin, 2,5 % H₃PO₄) a jejich koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky NaNO₂ při 540 nm. Hladiny glycerolu v médiu byly stanoveny pomocí chromotropového činidla při 570 nm [14] a VMK pomocí RANDOX NEFA (nonesterified free fatty acid) kitu při 550 nm.

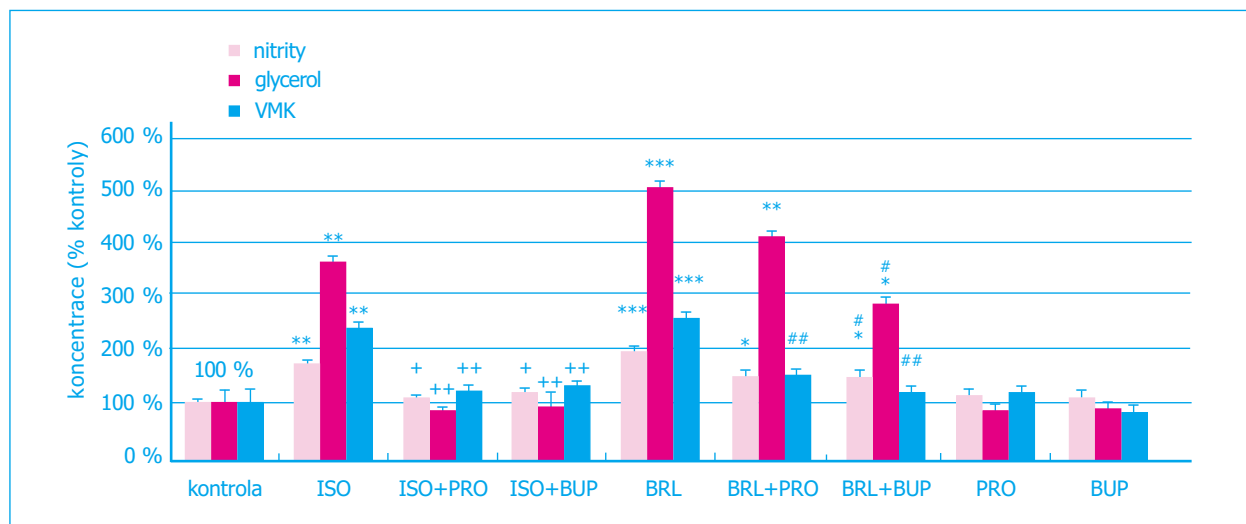
Statistická analýza

Všechny experimenty byly provedeny na adipocytech získaných z nejméně 3 potkanů a vyhotovených v triplikátech pro každou reakční skupinu. Tak byly pro statistickou analýzu získány průměry z minimálně 9 hodnot. Statistická významnost rozdílu dvou průměrů byla stanovena pomocí nepárového dvouvýběrového Studentova *t*-testu. Pro porovnání více skupin byla použita analýza rozptylu ANOVA s *post hoc* Tukey-Kramerovou metodou mnohonásobného porovnávání. Prostá

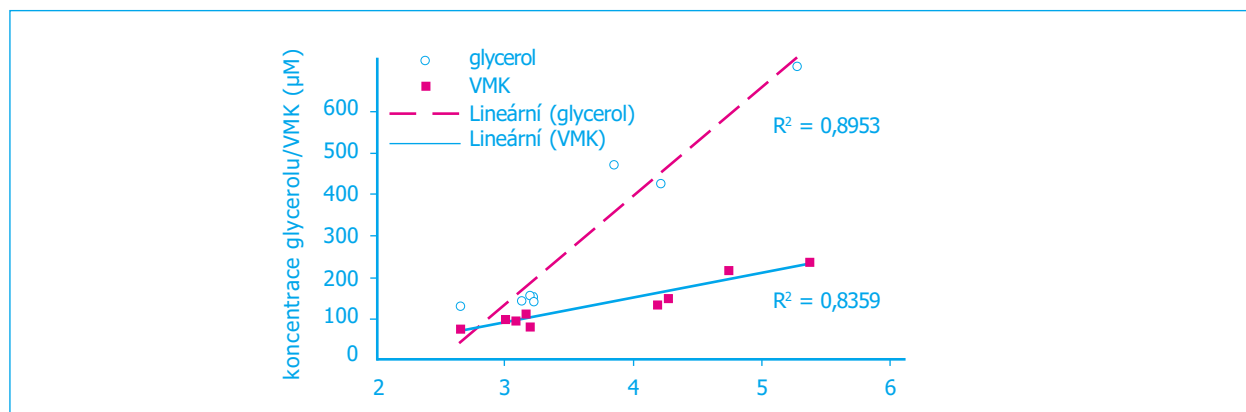
analýza lineární regrese byla použita k určení závislosti mezi produkcí nitritů a lipolytickou aktivitou látek působících na β -AR, síla této závislosti (korelace) byla vyjádřena koeficientem determinace (R^2). Za statisticky signifikantní byla považována ta data, pro která byla dosažena hladina významnosti (p) nižší než 0,05.

Výsledky

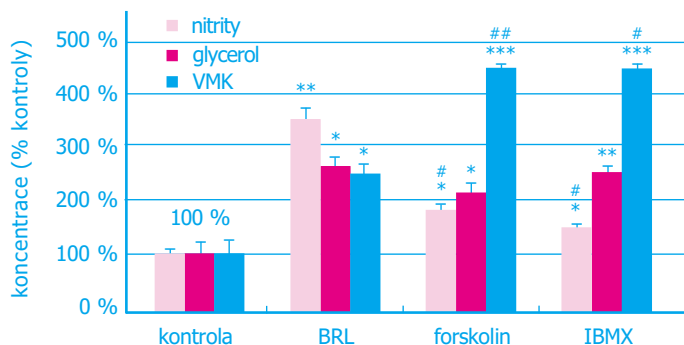
V primární kultuře adipocytů isoprenalin a BRL-37344 signifikantně zvýšily hladiny jak nitritů, tak i glycerolu a VMK, přičemž β_3 -AR agonista BRL-37344 byl účinnější ve všech parametrech vzhledem k 10 \times nižší použité koncentraci. Naopak β -AR antagonisté propranolol a bupranolol významně snížily β -agonisty indukovanou produkci NO a lipolýzu (**Obr. 1**). Navíc byla po podání β -AR agonistů a antagonistů a jejich párů zjištěna významná pozitivní korelace ($p < 0,001$) mezi hladinami nitritů a glycerolu ($R^2 = 0,90$), resp. VMK ($R^2 = 0,84$) (**Obr. 2**).



OBR. 1. VLIV β -AGONISTŮ ISOPRENALINU (ISO) A BRL-37344 (BRL) A JEJICH ANTAGONISTŮ PROPANOLOLU (PRO) A BUPRANOLOLU (BUP) NA PRODUKCI NITRITŮ, GLYCEROLU A VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN (VMK) V 24 H PRIMÁRNÍ KULTUŘE ADIPOCYTŮ. PRO PRŮMĚRY PŘÍSLUŠNÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ \pm SEM – ANOVA: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ A *** $P < 0,001$ VS KONTROLA; + $P < 0,05$ A ++ $P < 0,01$ VS ISOPRENALIN; # $P < 0,05$ A ## $P < 0,01$ VS BRL.

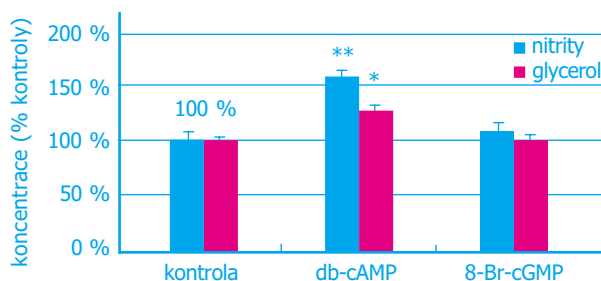


OBR. 2. LINEÁRNÍ REGRESE A KORELACE MEZI HLADINAMI NITRITŮ A GLYCEROLU NEBO VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN (VMK) PRO SDRUŽENÉ PRŮMĚRY ZÍSKANÉ PO 24 H INKUBACI ADIPOCYTŮ S β -AGONISTY, β -ANTAGONISTY NEBO JEJICH KOMBINACEMI. R^2 = KOEFICIENT DETERMINACE.

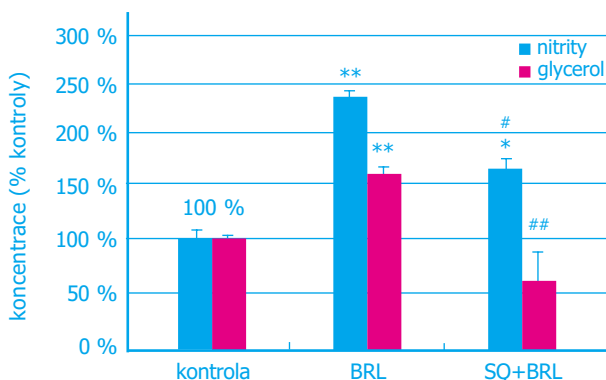


OBR. 3. VLIV AKTIVÁTORŮ KASKÁDY ADENYLYLCYKLÁZA/CAMP – BRL-37344 (BRL), FORSKOLINU A 3-ISOBUTYL-1-METYLXANTINU (IBMX) NA PRODUKCI NITRITŮ, GLYCEROLU A VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN (VMK) ADIPOCYTY INKUBOVANÝCH V KULTUŘE 150 MIN.

PRO PRŮMĚRY PŘÍSLUŠNÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ ± SEM – ANOVA: * P<0,05, ** P<0,01 A *** P<0,001 VS KONTROLA; # P<0,05 A ## P<0,01 VS BRL.

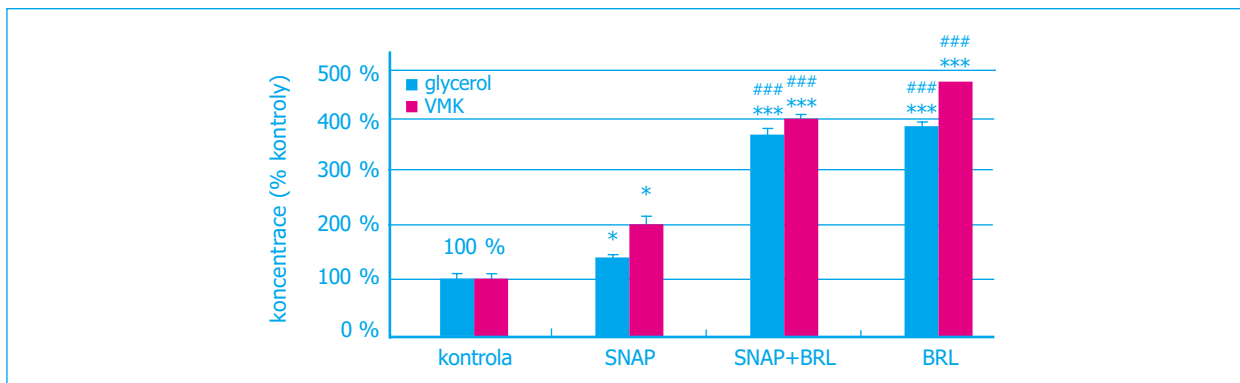


OBR. 4. VLIV ANALOGŮ 2. POSLŮ CAMP A CGMP NA PRODUKCI NITRITŮ A GLYCEROLU V 24 H PRIMÁRNÍ KULTUŘE ADIPOCYTŮ. PRO PRŮMĚRY PŘÍSLUŠNÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ ± SEM – NEPÁROVÝ STUDENTŮV T-TEST: * P<0,05 A ** P<0,01 VS KONTROLA.

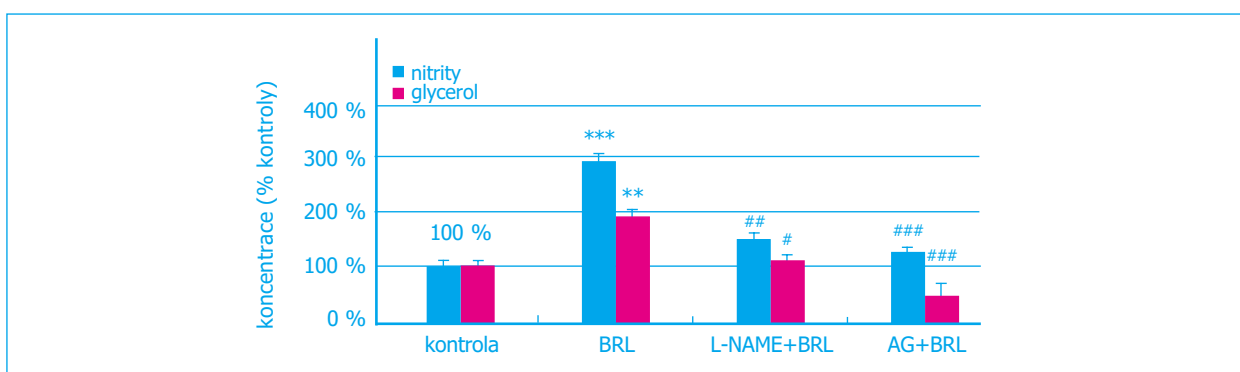


OBR. 5. VLIV INHIBITORU ADENYLYLCYKLÁZY SQ 22,536 (SQ) NA BRL-37344 (BRL) STIMULOVANOU PRODUKCI NITRITŮ A GLYCEROLU PO 60 MIN INKUBACI ADIPOCYTŮ. PRO PRŮMĚRY PŘÍSLUŠNÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ ± SEM – ANOVA: * P<0,05 A ** P<0,01 VS KONTROLA; # P<0,05 A ## P<0,01 VS BRL.

Látky stimulující intracelulární produkci cAMP, forskolin a IBMX, již po 60 min kultivace signifikantně indukovaly vyplavování glycerolu z adipocytů, které bylo po 150 min následováno progresivním zvýšením bazálních hladin nitritů a VMK (*Obr. 3*). Samotný db-cAMP vykazoval ještě ve 24. hodině stejný efekt na produkci NO a stimulaci lipolýzy (*Obr. 4*). Naopak inhibitor adenylcyklázy SQ 22,536 významně snížil BRL-indukovanou produkci NO a lipolýzu a to již po 30 min inkubace s maximem v 60. minutě (*Obr. 5*).



OBR. 6. VLIV DONORU NO, S-NITROSO-N-ACETYL-PENICILLAMINU (SNAP), NA BRL-37344 (BRL) INDUKOVANÉ UVOLNĚNÍ GLYCEROLU A VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN (VMK) Z ADIPOCYTŮ PO 24 H. PRO PRŮMĚRY PŘÍSLUŠNÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ ± SEM – ANOVA: * P<0,05 A *** P<0,001 VS KONTROLA; ### P<0,001 VS SNAP.



OBR. 7. VLIV NOS INHIBITORŮ N^o-NITRO-L-ARGININ-METYLESTERU (L-NAME) A AMINO GuanidINU (AG) NA BRL-37344 (BRL) INDUKOVANOU PRODUKCI NITRITŮ A GLYCEROLU PO 150 MIN INKUBACI ADIPOCYTŮ V PRIMÁRNÍ KULTUŘE. PRO PRŮMĚRY PŘÍSLUŠNÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ ± SEM – ANOVA: ** P<0,01 A *** P<0,001 VS KONTROLA; # P<0,05, ## P<0,01 A ### P<0,001 VS BRL.

Z látek zasahujících do signálních mechanismů NO právě SNAP jako exogenní donor NO přirozeně elevoval hladiny nitritů v médiu až 27× oproti kontrole a 19× oproti BRL samotnému (data nejsou prezentována). Navíc SNAP významně zvýšil uvolňování glycerolu a VMK z nestimulovaných adipocytů, přičemž byl méně efektivnější v indukcii lipolýzy než BRL a zásadně neovlivnil BRL-indukovanou lipolýzu (**Obr. 6**). Jak nespecifický inhibitor eNOS/iNOS, L-NAME, tak specifický iNOS inhibitor, aminoguanidin, již po 150 min inkubace signifikantně a dlouhodobě (24 hodin) potlačily BRL-indukovanou produkci NO a lipolýzu (**Obr. 7**). 8-Br-cGMP jako analog 2. posla v endogenní kaskádě NO/guanylylcykláza/cGMP, neměl žádný vliv na lipolýzu (**Obr. 4**).

Závěr

Naše výsledky naznačují, že stimulace β-AR, převážně pak β₃-AR, aktivující kaskádu adenylylcykláza/cAMP vede nejenom k lipolýze adipocytů, ale současně indukuje produkci NO, který zřejmě svým působením na některou ze složek této transdukční cesty potencuje výsledný lipolytický efekt a jako signální molekula s mnohočetnými účinky tak hraje důležitou úlohu v metabolismu lipidů bílé tukové tkáně. Toto tvrzení může být podpořeno zde prezentovány výsledky, kdy β-AR agonisty indukovaná syntéza NO a lipolýza byly významně inhibovány specifickými a v menší míře i nespecifickými β-AR antagonisty. Navíc byla, dle dostupné literatury, vůbec poprvé v naší studii stanovena pozitivní korelace mezi produkcí NO, resp. hladinami nitritů, a lipolýzou, resp. hladinami glycerolu nebo VMK v kulturačním médiu. Podobně látky zvyšující intracelulární hladiny cAMP stimulovaly jak produkci NO tak lipolýzu a naopak inhibitor adenylylcyklázy působil negativně na oba sledované parametry. Recipročně exogenně podaný NO indukoval lipolýzu v kultivovaných adipocytech, kdežto inhibitory NOS bez rozdílu zamezily indukcii lipolýzy navozenou podáním β₃-AR agonisty. Uvedené údaje lze shrnout do hypotézy, že v signální kaskádě adenylylcykláza/cAMP aktivované přes β-AR je zapojen také NO, který tak svým působením může regulovat proces lipolýzy. K potvrzení této hypotézy je potřeba i nadále pokračovat v naší experimentální práci s cílem podat ucelený obraz o modulačním působení produkce NO na metabolismu lipidů v adipocytech bílé tukové tkáně.



Poděkování

Uvedená práce vznikla za podpory grantu IGA MZ NL 7418/3 a výzkumného záměru J13/98:111100002. Rádi bychom také poděkovali Dr. Radimovi Petrášovi a Dr. Dorothea Diewald z firmy Schwarz Pharma za darování bupranololu.

Citace

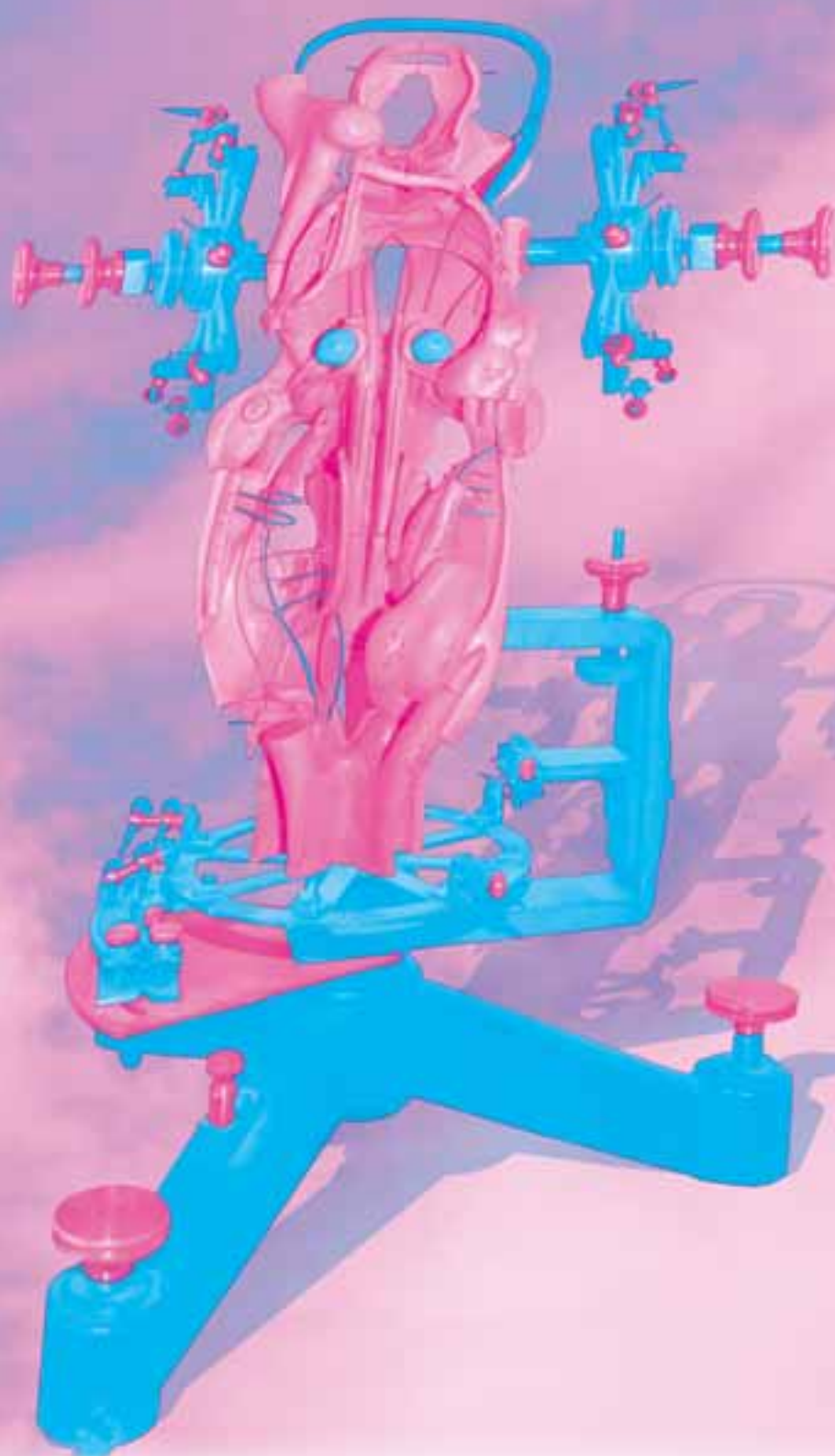
1. J.J. Díez, P. Iglesias, *The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease*, *Eur J Endocrinol* 148 (2003) 293-300.
2. F. Bertile, F. Criscuolo, H. Oudart, Y. Le Maho, T. Raclot, *Differences in the expression of lipolytic-related genes in rat white adipose tissues*, *Biochem Biophys Res Commun* 307 (2003) 540-546.
3. V. Prpic, P.M. Watson, I.C. Frampton, M.A. Sabol, G.E. Jezek, T.W. Gettys, *Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity*, *Endocrinology* 144 (2003) 1155-1163.
4. C.E. Juge-Aubry, E. Somm, V. Giusti, A. Pernin, R. Chicheportiche, C. Verdumo, F. Rohner-Jeanrenaud, D. Burger, M.J. Dayer, C.A. Meier, *Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist - Upregulation in obesity and inflammation*, *Diabetes* 52 (2003) 1104-1110.
5. V. Prpic, P.M. Watson, I.C. Frampton, M.A. Sabol, G.E. Jezek, T.W. Gettys, *Adaptive changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity*, *J Nutrition* 132 (2002) 3325-3332.
6. S.P. Commins, P.M. Watson, N. Levin, R.J. Beiler, T.W. Gettys, *Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different beta-adrenoceptor subtypes*, *J Biol Chem* 275 (2000) 33059-33067.
7. B.M. Spiegelman, J.S. Flier, *Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture*, *Cell* 87 (1996) 377-389.
8. A. Giordano, C. Tonello, A. Bulbarelli, V. Cozzi, S. Cinti, M.O. Carruba, E. Nisoli, *Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus*, *FEBS Letters* 514 (2002) 135-140.
9. S. Kapur, F. Picard, M. Perreault, Y. Deshaies, A. Marette, *Nitric oxide: a new player in the modulation of energy metabolism*, *Int J Obesity* 24-Suppl. 4 (2000) S36-S40.
10. K. Andersson, N. Gaudiot, C. Ribiere, M. Elizalde, Y. Giudicelli, P. Arner, *A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo*, *Brit J Pharmacol* 126 (1999) 1639-1645.
11. M. Rodbell, *Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis*, *J Biol Chem* 239 (1964) 375-380.
12. S. Marshall, T. Garvey, M. Geller, *Primary culture of isolated adipocytes. A new model to study insulin receptor regulation and insulin action*, *J Biol Chem* 259 (1984) 6376-6384.
13. V. Briquet-Laugier, I. Dugail, B. Ardouin, X. Le Liepvre, M. Lavau, A. Quignard-Boulange, *Evidence for a sustained genetic effect on fat storage capacity in cultured adipose cells from Zucker rats*, *Am J Physiol* 267 (1994) E439-E446.
14. M. Lambert, A.C. Neish, *Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions*, *Can J Res* 28 (1950) 83-89.



1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA DĚKUJE SPONZORŮM KONFERENCE



CENA MEDICAL TRIBUNE



CENA MEDICAL TRIBUNE

Autor: Ingrischová Michaela, 5. r.
Školitel: As. MUDr. Paleček Tomáš
Název práce: Jednorozměrné barevné mapování systolického transatriálního průtoku: nová metoda hodnocení compliance levé síně



Michaela Ingrisová převzala z rukou MUDr. Tomáše Novotného cenu Medical Tribune.

6. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE



Zpracovalo Oddělení vnějších vztahů 1. LF UK

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

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

Fotografie Vladimír Brada (ZDN), Mgr. Karel Meister

Sazba Monika Vejrostová, Galén

Tisk GLOS, Špidlenova 436, 513 01 Semily

ISBN 80-7262-352-4

2005

