

ABSTRAKTA 2013

PŘEDNÁŠKY

01. SYNCHRONIZAČNÍ ÚČINEK MELATONINU NA PERIFERNÍ OSCILÁTORY JATER A TLUSTÉHO STŘEVA

Houdek P., Parkanová D., Sumová A.

Oddělení neurohumorálních regulací, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

Školitel: PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Úvod: Vlivem pravidelného střídání světla a tmy a mnoha dalších rytmických faktorů v přírodě s tím spojených si vyvinuly organismy na Zemi cirkadiánní systém, který jim umožňuje tyto cyklické změny předjímat a připravit se na ně. U savců je centrální oscilátor cirkadiánního systému uložen v suprachiasmatických jádrech hypotalamu a je seřizován světlem dopadajícím na sítnici. Centrální oscilátor dále seřizuje prostřednictvím komplexních neurohumorálních mechanismů oscilátory periferních tkání. Centrální i periferní oscilace jsou na molekulární úrovni založeny na rytmické expresi tzv. hodinových genů, jejichž transkripce a translace jsou zapojeny ve zpětnovazebných smyčkách. Povaha signálů, kterými centrální hodiny seřizují hodiny v periférii, není podrobně známa. Jedním z možných mediátorů je hormon melatonin, jehož sekrece vykazuje cirkadiánní rytmus s maximem v nočních hodinách a nízkými hladinami během dne a jehož receptory jsou přítomny v řadě periferních tkání.

Cíl: V naší práci jsme sledovali, zda exogenně podaný melatonin může synchronizovat expresi hodinových genů v játrech a v epitelu tlustého střeva potkanů, u kterých byly díky dlouhodobému pobytu na stálém světle narušeny cirkadiánní rytmy v pohybové aktivitě a potlačena produkce endogenního melatoninu.

Materiál a metody: Potkanům kmene Wistar (celkem 70 zvířat) byl během 5. týdne pobytu na stálém světle aplikován pravidelně mezi 17:00 a 18:00 h melatonin (i.p., 1 mg/kg) nebo vehikulum. Vzorky tkání byly odebrány v pravidelných intervalech během dne a noci a exprese hodinových genů Per1, Per2, Rev-Erba a Bmal1 byla stanovena metodou RT-PCR.

Výsledky: Opakované podávání melatoninu potkanům synchronizovalo v játrech expresi genu Per1 ($p = 0,002$) a Per2 ($p < 0,0001$) a posílilo synchronizaci exprese genu Bmal1 ($p < 0,0001$). V tlustém střevě opakované podávání melatoninu synchronizovalo expresi genu Per2 ($p = 0,049$) a Rev-Erba ($p = 0,0005$) a posílilo synchronizaci exprese genu Bmal1 ($p < 0,0001$).

Závěr: Zjistili jsme, že podávání melatoninu může synchronizovat expresi některých hodinových genů jak v játrech, tak v tlustém střevě. Výsledky tedy podporují hypotézu, že melatonin se podílí na signalizaci od centrálních hodin k periferním a přispívá tak k seřizování periferních hodin s denní dobou.

Podpora projektu: grant GAČR P303/11/0668

02. SILDENAFIL SNIŽUJE PLICNÍ HYPERTENZI PO AKUTNÍ PLICNÍ EMBOLII PŘI CHRONICKÉ HYPOXII

Mizera R.^{1,2}, Hodyc D.¹, Herget J.¹

¹Ústav fyziologie UK 2.LF; ²Traumatologicko-ortopedické centrum, Krajská nemocnice Liberec a.s.

Školitel: prof. MUDr. Jan Herget DrSc.

Úvod: Na rozvoji plicní hypertenze po akutní plicní embolii (PE) se podílejí 2 základní mechanismy – obstrukce plicních cév embolem a vazokonstrikce. V průběhu chronické hypoxie proliferují hladké svalové buňky plicních cév a dochází tak ke snížení plicní cévní poddajnosti. Předpokládali jsme, že pokles cévní poddajnosti povede k vyššímu vzestupu tlaku v plícnici po PE.

Cíl: Naším cílem bylo ověřit vliv inhibitoru fosfodiesterázy 5 – Sildenafilu – na plicní hypertenzi po PE u krys vystavených 5 denní hypoxii.

Materiál a metody: V experimentu jsme použili model in vivo plicní embolie aplikací sephadexových mikrosferul do vena jugularis, poté jsme měřili změny perfuzního tlaku a vazokonstrikce na preparátu izolovaných plic laboratorního potkana. Samci potkanů kmene Wistar byli rozděleni do 5 skupin: NN: kontrolní skupina (n=6), H: 5denní hypoxie (n=6), E: plicní embolie (n=6), HE: plicní embolie po 5denní hypoxii (n=6), HES: plicní embolie po 5denní hypoxii, podávání Sildenafilu (n=6). Sildenafil byl podáván žaludeční gaváží v průběhu 5ti denní hypoxie. Míru vazokonstrikce jsme měřili po přidání nitroprusidu sodného do perfuzního roztoku izolovaných plic.

Výsledky: Potkani vystavení chronické hypoxii (skupina HE) měli signifikantně vyšší perfuzní tlak po plicní embolii než potkani, kteří chronické hypoxii vystavení nebyli (skupina E). Perfuzní tlak ve skupině HES (podávání sildenafilu) byl signifikantně nižší než ve skupině HE. Mezi jednotlivými skupinami nebyl signifikantní rozdíl v míře vazokonstrikce po PE.

Závěr: Vzestup plicního perfuzního tlaku po PE je vyšší u potkanů, kteří byli vystavení chronické hypoxii. Podávání Sildenafilu v průběhu chronické hypoxie snižuje plicní hypertenzi po PE. Tento efekt je způsoben spíše snížením plicní cévní poddajnosti než změnou vazokonstrikce plicních cév.

Podpora projektu: Tento projekt byl podpořen grantem GA UK č. 634112/2012

03. GENETICKÉ VYŠETŘENÍ PŘÍBUZNÝCH PACIENTŮ S HYPERTROFICKOU KARDIOMYOPATÍ

Tomašov P.¹, Minárik M.², Zemánek D.¹, Čadová P.¹, Homolová S.¹, Čurila K.³, Pěnička M.³, Gregor P.³, Benešová L.², Belšánová B.², Veselka J.¹

¹Kardiologická klinika 2. LF UK a FN v Motole; ²Genomac Research Institute, laboratoř molekulární genetiky a onkologie; ³III interní klinika, klinika kardiologie, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady

Školitel: Prof. MUDr. Josef Veselka CSc.

Úvod: Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je nejčastější dědičné onemocnění kardiovaskulárního systému s velkou genetickou heterogenitou. Příbuzní prvního stupně pacientů s HCM mají 50% riziko přenosu příčinné mutace. Genetické vyšetření je přínosné v identifikaci nositelů příčinné mutace. Při nedostupnosti genetického vyšetření musí být příbuzní pravidelně klinicky vyšetřováni.

Cíl: Určit vliv genetického vyšetření na řízení péče o příbuzné pacientů s HCM a určit použitelnost echokardiografických kritérií k rozlišení příbuzných s pozitivním a negativním fenotypem.

Materiál a metody: Skupinu 99 nepříbuzných pacientů s HCM jsme vyšetřili na přítomnost mutací v genech MYH7, MYBPC3, TNNI3 a TNNT2. V rodinách s identifikovanou patogenní mutací jsme provedli klinické a genetické vyšetření příbuzných na přítomnost dané mutace.

Výsledky: Identifikovali jsme 38 genetických variant u 47 pacientů (47 %). Patnáct variant u 21 pacientů (21 %) bylo patogenními mutacemi. Provedli jsme genetické vyšetření 52 příbuzných (18 z nich (35 %) s pozitivním výsledkem). Genetické vyšetření jednoho pacienta s HCM nám umožnilo upustit v průměru od 2,45 – 5,15 budoucích klinických vyšetření příbuzných. Žádné ze sledovaných echokardiografických kritérií nebylo signifikantně rozdílné mezi příbuznými s pozitivním a negativním fenotypem, s výjimkou echokardiografického indexu kombinujícího morfologické a funkční parametry (genotyp pozitivní vs. genotyp negativní, 3,316 vs. -0,489, $p=0,01$).

Závěr: Naše práce potvrzuje roli genetického vyšetření v řízení péče o příbuzné pacientů s HCM a našla pouze omezený význam echokardiografického vyšetření v identifikaci nositelů příčinné mutace.

Podpora projektu: Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) a granty IGA (Ministerstva zdravotnictví) NT 11401-5 a 9164/3.

04. DLOUHODOBÉ VÝSLEDKY TRVALÉ EPIKARDIÁLNÍ STIMULACE U DĚTÍ V ČESKÉ REPUBLICE

Kubuš P., Materna O., Janoušek J.
Dětské kardiocentrum FN v Motole, Praha
Školitel: Prof. MUDr. Jan Janoušek, Ph.D.

Úvod: Přístup k trvalé kardiostimulaci u dětí je ovlivněn řadou faktorů. Mezi nejdůležitější patří věk, přítomnost strukturální srdeční vady, limitovaný žilní přístup do srdce, riziko žilní trombózy a snaha o optimalizaci místa stimulace z důvodu prevence stimulací indukované kardiomyopatie.

Cíl: Zhodnotit dlouhodobé výsledky trvalé epikardiální stimulace u dětí

Materiál a metody: Výsledky po implantaci epikardiálního stimulačního systému (N=119, síňová stimulace/AAI=5, komorová stimulace/VVI=39, dvoudutinová stimulace/DDD=75) ve věku <18 let (medián 1,8, IQR 0,3–6,4 roku) byly retrospektivně hodnoceny u všech pacientů v období 1977–2009. V průběhu sledování (medián 6,4, IQR 2,9–11,1 roku) bylo implantováno 207 generátorů, 89 síňových a 153 komorových elektrod. Indikací byla v 86,6% atrioventrikulární blokáda, vrozená srdeční vada byla přítomna u 76,5%. Ztráta funkčnosti stimulačního systému byla definována jako dosažení některého z endpointů: výměna generátoru a/nebo výměna/revize/opuštění elektrody pro exit blok, nárůst stimulačního prahu, frakturu, poruchu izolace, růst pacienta, předčasné (<3 roky) vyčerpání generátoru a infekci.

Výsledky: 5/10/15 let po primoimplantaci byla pravděpodobnost zachování funkčnosti stimulačního systému bez nutnosti chirurgické revize pro definované endpointy 70,9/52,4/29,9% a pravděpodobnost trvalé stimulace epikardiálním systémem 92,8/76,1/58,2%. Použití steroidních elektrod snížilo riziko exit bloku (HR 0,25, CI 0,11–0,55, P <0,001) s pravděpodobností jeho absence po 5 letech 95,3 oproti 76,2% (P <0,001). Ve skupině elektrod Medtronic 4965/4968 (N=196) bylo riziko fraktury/porušení izolace nebo nutnosti elektivní revize z důvodu růstu pacienta nižší u bipolárních než u unipolárních elektrod (HR 0,12, CI 0,02–0,73, P=0,021) s pravděpodobností absence této komplikace po 10 letech 97,6 proti 80,5% (P =0,011). Použití systému AutoCapture™ (HR 0,07, CI 0,02–0,34, P<0,001) a steroidních elektrod (HR 0,27, CI 0,09–0,82, P=0,02) významně prodloužilo životnost baterie generátoru. Žádný pacient nezemřel na selhání/infekci stimulačního systému.

Závěr: Pravděpodobnost trvání epikardiální stimulace je u dětí vysoká (~75 a 60% 10 a 15 let po implantaci) a účinně odsouvá nutnost transvenózní stimulace do vyššího věku. Použití bipolárních steroidních elektrod a funkce AutoCapture™ významně prodlužují životnost stimulačního systému a snižují tak nutnost reintervencí.

Podpora projektu: Podpořeno výzkumným záměrem FN v Motole č. MZOFNM2005

05. AKTIVACE TH17 DRÁHY U PACIENTŮ S DIABETEM 1.TYPU A JEJICH PRVOSTUPŇOVÝCH PŘÍBUZŇNÝCH

Včeláková J, Petruželková L, Koloušková S, Šťavíková V, Ulmannová T, Labíková J, Štechová K
Pediatrická klinika, 2.lékařská fakulta, Karlova Univerzita, Praha, ČR

Školitel: doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

Úvod: Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je onemocnění, které se vyznačuje zánikem beta-buněk pankreatu vedoucím k absolutnímu nedostatku inzulínu. Preklinickou fází onemocnění je možné rozpoznat měsíce i roky před samotnou manifestací pomocí asociovaných autoprotilátek. DM1 je autoimunitní onemocnění na jehož vzniku se podílí především pomocné T lymfocyty (Th) a prozánětlivé nastavení imunitní odpovědi.

Cíl: Zaměřili jsme se na efekt diabetogenních autoantigenů a jejich vliv na mononukleární buňky periferní krve (PBMC) s cílem identifikovat buněčné procesy asociované s prediabetickou a diabetickou fází onemocnění.

Materiál a metody: Periferní krev byla odebrána od prvostupňových příbuzných s DM1 (DRL), čerstvě manifestovaným pacientům s DM1 a od zdravých kontrol (ZK). Vyizolované PBMC byly inkubovány 72 hodin v médiu s/bez diabetogenních autoantigenů. Poté byla z kultury vyizolovaná total RNA a provedena analýza u 43 probandů pomocí vysokodenzitní „Phalanx arrays“ (DM1 n=12, DRL protilátkově negativní(Abs-) n=9, DRL protilátkově pozitivní(Abs+) n=9 a ZK n=13). Následně jsme pomocí qRT-PCR měřili genovou expresi IL-6, -17, -23, TGFbeta, RORC, FOXP3 a STAT3. Data byla normalizována vůči GUSB a B2M. qRT-PCR data byla měřena na nezávislé kohortě 50 probandů (DM1 n=15, DRL-Abs- n=13, DRL-Abs+ n=11 a ZK n=11) pomocí „TaqMan Gene Expression arrays“.

Výsledky: V „čipové studii“ bylo nejvíce signifikantně změněných imunologických drah (24%) nalezeno po porovnání DM1 a ZK. Na 1.místě byla antigenní prezentace přes MHC II.třídny. Na 2.místě byla dráha pro prozánětlivou Th17 diferenciaci.

Po zaměření na Th17 dráhu pomocí qRT-PCR jsme zjistili signifikantní změny především mezi DM1 a DRL-Abs-. Zde byla u DM1 zvýšená genová exprese IL-6 ($p=0,007$), -17 ($p=0,005$), -23 ($p=0,046$) a TGFbeta ($p=0,042$), což jsou základní cytokiny účastníci se Th17 diferenciaci. Zároveň DM1 měli i zvýšené hladiny transkripčních faktorů FOXP3 ($p=0,022$), STAT3 ($p=0,019$) a RORC ($p=0,086$). Podobný trend byl patrný i mezi DM1 a ZK. Při porovnání mezi DM1 a DRL-Abs+ jsme nenalezli žádné signifikantní změny, což svědčí o obdobném prozánětlivém nastavení.

Závěr: U čerstvě manifestovaných pacientů s DM1 je zvýšená prozánětlivá Th17 odpověď. Zároveň vidíme aktivaci regulačních mechanismů v podobě zvýšení FOXP3 a TGFbeta. Z našich výsledků je možné říci, že se organismus pravděpodobně snaží regulovat přítomný zánět a je patrná aktivace Th17 i Tregs drah.

Podpora projektu: Podpořeno projektem MZ00064203 (FN MOTOL) a IPL 699 001 (Pediatrická klinika, 2.LF, UK, Praha)

06. PRODUKCE CYTOKINŮ MONONUKLEÁRNÍMI BUŇKAMI PERIFERNÍ KRVE ODRÁŽÍ PROTILÁTKOVÝ PROFIL PACIENTŮ S DIABETEM 1. TYPU

Labiková J, Včeláková J, Ulmannová T, Koloušková S, Štechová K
Pediatrická klinika 2.LF UK a FN Motol

Školitel: doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

Úvod: Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je závažné orgánově specifické autoimunitní onemocnění charakteristické nevratnou destrukcí β buněk pankreatu imunitním systémem, což vede k absolutnímu nedostatku insulinu. Autoimunitní zánět v β buňkách je možné určit dlouhou dobu před samotnou manifestací DM1 pomocí detekce specifických autoprotilátek ze séra pacientů. Na zničení β buněk se podílí zejména autoreaktivní T lymfocyty. Za nejvíce patologickou je považována prozánětlivá Th1 odpověď. Diskutována je i role Th17 lymfocytů, které se také mohou podílet na regulaci zánětu.

Cíl: Tato studie se zabývá vlivem syntetických diabetogenních autoantigenů GAD65 a IA2 na cytokinovou odpověď mononukleárních buněk periferní krve diabetiků. Otázkou je, zda se pacienti s různým protilátkovým profilem liší i v buněčné reaktivitě (produkci cytokinů).

Materiál a metody: Studii jsme prováděli na pacientech ($n = 40$) s potvrzenou diagnózou DM1 pozitivních na anti-GAD65 a anti-IA2 protilátky. Pacienty jsme podle hladiny autoprotilátek rozdělili do čtyř skupin. Pomocí průtokové cytometrie jsme ve vzorcích PBMC měřili zastoupení základních buněčných populací. Buňky jsme stimulovali třemi různými koncentracemi GAD65 a IA2 a cytokinovou odpověď (IFN-gama, IL17) jsme detekovali pomocí ELISPOTu.

Výsledky: Nalezli jsme signifikantní interakce mezi způsobem stimulace (typ a koncentrace antigenu) a protilátkovým profilem pacienta při ovlivnění produkce IFN-gama ($p = 0,003$) i IL17 ($p < 0,001$). Hladina anti-IA2 protilátek v séru koreluje pozitivně se zastoupením Tc ($p = 0,004$) a negativně se zastoupením Th ($p = 0,001$) lymfocytů v PBMC. Produkce IFN-gama koreluje pozitivně se zastoupením T lymfocytů ($p = 0,001$) a negativně se zastoupením NK buněk ($p = 0,001$) ve vzorku.

Závěr: Z našich výsledků vyplývá, že protilátkový profil pacienta odráží i rozdílnou buněčnou reaktivitu. Tento pohled by mohl být přínosný při navrhování imunointervenčních postupů u DM1. Je zřejmé, že pro jejich úspěšnost je nutný individuální přístup, protože pacienti se svými molekulárními reakcemi liší.

Podpora projektu: Tato studie byla podpořena projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (Pediatrická klinika FN MOTOL), IPL699001, IGA NT/11407-5.

07. POLYMORFISMUS GENU PRO CONNEXIN 37 (C1019T) JAKO MODULÁTOR ZMĚN KREVŇÍHO TLAKU U PACIENTEK S DIABETES MELLITUS 1. TYPU

Piřhová P.¹, Piřha J.², Hubáček J.², Kvapil M.¹

¹Interní klinika UK 2. LF a FN v Motole; ²Laboratoř pro výzkum aterosklerózy IKEM

Školitel: prof.MUDr.Milan Kvapil, CSc,MBA

Úvod: Diabetes mellitus patří mezi nejneřivější kardiovaskulární rizikové faktory. Citlivost pacientů postižených touto nemocí k cévnímu poškození je však výrazně rozdílná. Jedním z důvodů je jistě genetická determinace.

Cíl: V našich předchozích průřezových analýzách jsme zjistili, že gen pro connexin 37 by mohl být modulátorem vlivu glykémie na cévní systém v ženské populaci s poruchou látkové výměny glycidů a to především u pacientek s diabetes mellitus 1. typu. V současné práci jsme se zaměřili na vliv connexinu 37 na vývoj rizikových faktorů v longitudinální studii.

Materiál a metody: Byla analyzována data 133 pacientek s diabetes mellitus 1. typu, které nebyly farmakologicky léčeny antihypertenzivy a byly dle standardního protokolu opakovaně vyšetřeny v 2letém intervalu z hlediska přítomnosti tradičních i nově sledovaných kardiovaskulárních rizikových faktorů. U všech byla provedena genetická analýza polymorfismu genu pro connexin 37 (C1019T). Hodnotili jsme možný vliv variant tohoto genu na změnu sledovaných kardiovaskulárních rizikových faktorů v daném období: tělesné váhy, centrální obezity, krevního tlaku, lipidových parametrů a známek preklinické aterosklerózy vyjádřené jako tloušťka intimy-medie karotických tepen měřené ultrazvukem a poměrů systolických tlaků kotníků/paže. Krevní tlak byl měřen v pozici vleže (po 10minutách klidu)na P paži, 3 hodnoty, jako výsledek brán průměr z těchto 3 hodnot.

Výsledky: Ve sledovaném období došlo k významně většímu vzestupu systolického krevního tlaku u nositelek genotypu CC (n=56) a genotypu CT (n= 63) v porovnání s nositelkami TT genotypu (n=14). Změny diastolického tlaku se mezi oběma skupinami významně nelišily. Všechny skupiny se nelišily ani ve věku, době trvání diabetu, ani ukazatelích metabolické kompenzace a lipidového spektra.Současně se skupiny nelišily ani ve změnách ostatních sledovaných rizikových faktorů včetně známek preklinické aterosklerózy. Výsledky viz Tab.1 (hodnoty TK v mmHg).

	TK systol (mmHg)	TK systol. za 2 roky (mmHg)	rozdíl (mmHg)	p
CC genotyp	120,75 ± 73,75	127,44 ± 14,41	6,68	< 0,05 proti TT
CT genotyp	118,22 ± 11,31	124,11 ± 74,24	5,89	< 0,05 proti TT
TT genotyp	119, 14 ± 12,89	121,50 ± 13,32	2,36	x

Závěr: Dle našich dat je gen pro connexin 37 významným modulujícím faktorem změny systolického krevního tlaku u pacientek s diabetes mellitus 1. typu již v poměrně krátkém časovém období 2 let. Tyto nálezy je nutné potvrdit v dlouhodobějším sledování většího počtu pacientek.

08. SISCOM, PET A INVAZIVNÍ EEG U PACIENTŮ OPEROVANÝCH PRO LOŽISKOVOU EXTRATEMPORÁLNÍ MRI NELEZIONÁLNÍ EPILEPSII

Kudr M.¹, Kršek P.¹, Marusič P.², Tomášek M.², Trnka J.³, Michalová K.⁴, Jarůšková M.⁵, Šanda J.⁶, Kynčl M.⁶, Zámečník J.⁷, Rybář J.¹, Jahodová A.¹, Mohapl M.⁸, Komárek V.¹, Tichý M.⁹

¹Klinika dětské neurologie, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, FN Motol; ²Neurologická klinika, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, FN Motol; ³Ústav nukleární medicíny, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, VFN; ⁴Klinika nukleární medicíny a endokrinologie, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, FN Motol; ⁵Oddělení nukleární medicíny, PET Centrum, FN Homolka; ⁶Klinika zobrazovacích metod, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, FN Motol; ⁷Ústav patologie a molekulární medicíny, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, FN Motol; ⁸Neurochirurgická klinika, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, ÚVN; ⁹Neurochirurgická klinika dětí a dospělých, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, FN Motol

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Kršek Ph.D.

Úvod: Pro pacienty s farmakorezistentní ložiskovou epilepsií je často jedinou nadějí na plnohodnotný život resekční operace postižené mozkové tkáně. Jejím cílem je odstranění epileptogenní zóny, tzn. oblasti mozku zodpovědné za vznik záchvatů. Neexistuje jeden exkluzivní diagnostický test, který by epileptogenní zónu dokázal spolehlivě určit. Hypotéza o její lokalizaci vzniká jako průsečík nepřímých informací mnoha diagnostických postupů.

Vedle elektrofyziologických vyšetření mají v této diagnostice rozhodující roli neurozobrazovací metody, zejména MRI mozku. V případě negativního nálezu na MRI však mají důležitou roli funkční zobrazovací metody jako je iktální SPECT (a jeho modalita SISCOM) a FDG-PET.

Cíl: Zhodnotit přínos SISCOM, PET a invazivního EEG vyšetření v lokalizaci epileptogenní zóny u pacientů operovaných pro farmakorezistentní ložiskovou extratemporální epilepsii s normálním MRI nálezem.

Materiál a metody: Retrospektivně jsme zhodnotili nálezy u 14 pacientů operovaných pro farmakorezistentní ložiskovou extratemporální epilepsii na podkladě fokální kortikální dysplazie (FCD), u kterých byl normální nález na MRI mozku. Koregistrovali jsme předoperační nálezy na SISCOM a PET snímcích s pooperačními MRI snímky a vizuálně jsme zhodnotili, zda a v jakém rozsahu byla resekována mozková tkáň pod SISCOM ložiskem, oblastí PET hypometabolismu a mozková kůra s patologickými změnami na invazivním EEG. Tyto výsledky a výsledky histopatologického vyšetření resekované tkáně byly porovnány s výsledkem operace stran záchvatů – více jak 90% redukce záchvatů byla považována za dobrý výsledek operace.

Výsledky: 13 pacientů mělo lokalizující nález na SISCOM vyšetření a 11 na PET vyšetření. Všichni pacienti s kompletně resekovaným SISCOM ložiskem (n=2), či oblastí hypometabolismu na PET (n=2) či s kompletně resekovanou mozkovou kůrou s patologickými změnami na invazivním EEG (n=7) měli příznivý výsledek operace. Významné redukce záchvatů však bylo dosaženo jen u některých pacientů s nekompletně resekovanou nebo neresekovanou mozkovou tkání určenou některou z výše uvedených modalit. Nebyla prokázána korelace mezi histopatologickým typem dysplazie a výsledkem operace.

Závěr: Kompletní resekce dysplastické mozkové tkáně lokalizovaná metodou SISCOM, PET či invazivním EEG vyšetřením je prediktorem dobrého výsledku operace.

Podpora projektu: Studie byla podpořena granty GAUK 17010, Kontakt Program ME09042, CZ.2.16/3.1.00/24022 a projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN Motol).

09. ÚLOHA ADENOSÍNOVÝCH RECEPTORŮ V POZÁCHVATOVÉM OBDOBÍ

Pařízková M., Ben Salem Z.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

Pregraduální student

Školitel: prof. MUDr. Pavel Mareš DrSc.

Úvod: Adenosin je významným modulátorem aktivity CNS. Kromě téměř všudypřítomných inhibičních A1 receptorů (největší koncentrace těchto receptorů je v neokortexu a hipokampu) jsou v mozku i excitační A2A receptory, lokalizované převážně v bazálních gangliích. A1 receptory se významně podílejí na ukončení epileptických záchvatů, úloha A2A receptorů byla prokázána v regulaci motoriky, ale v epileptických záchvatech je jejich role nejasná.

Cíl: Cílem bylo zjištění možné účasti excitačních A2A receptorů na modulaci epileptické aktivity. Ta je považována skoro výhradně za funkci A1 receptorů.

Materiál a metody: Korové epileptické následné výboje vyvolávané rytmickým drážděním sensorimotorické korové oblasti v krátkém časovém odstupu (1 minuta) byly použity jako modelové záchvaty. Studovali jsme dvě věkové skupiny - mláďata laboratorního potkana ve věku 12 a 25 dnů. U mladší věkové skupiny ještě není vyvinuta postiktální refrakternost, zatímco u 25denních mláďat je epileptická aktivita po určitou dobu po proběhlém záchvatu oslabena. Zvířatům byly implantovány epidurální stimulační a registrační elektrody, hodinu po odeznění éterové anestézie byly aplikovány 2 stimulační serie. Bezprostředně po skončení druhého následného výboje byl intraperitoneálně podán agonista A2A receptorů CGS21680 nebo antagonisty ZM241385 v dávce 1 nebo 2 mg/kg nebo 50% dimethylsulfoxid (rozpuštědlo, 2 ml/kg) a po 10 minutách byla dvojitá stimulace zopakována. Jednotlivé skupiny byly tvořeny 10 mláďaty. Hodnotili jsme trvání následných výbojů.

Výsledky: Dimethylsulfoxid významně prodlužoval trvání následných výbojů, zvláště u 12denních mláďat. Agonista A2A receptorů CGS21680 obdobně prodlužoval následné výboje u mladší věkové skupiny, zatímco u 25denních potkanů jsme pozorovali tendenci k prodloužení výboje jenom po dávce 1 mg/kg. Antagonista A2A receptorů ZM241385 prodlužoval následné výboje u 12denních mláďat i ve srovnání s rozpouštědlem, u 25denních mláďat neměl efekt.

Závěr: Dimethylsulfoxid použitý jako rozpouštědlo má výrazné prokonvulsivní účinky zvláště u 12denních mláďat. Obě dvě látky působící na A2A receptory vykazovaly účinek u mladší věkové skupiny, efekt antagonisty byl významný i při srovnání s rozpouštědlem. Věkově vázaný efekt, prokázaný v naší studii, ukazuje, že adenosinergní modulační systém má zřejmě větší efekt v tom vývojovém stadiu, kdy hlavní inhibiční systém (GABAergní) je ještě nezralý.

Podpora projektu: Studie byla financována z česko-amerického grantu číslo LH11015 a projektu GAČR P304/12/G069.

10. IMPACT OF ISCHEMIC INJURY ON THE GLUTAMATE RECEPTORS IN GLIAL CELLS IN THE CORTEX OF GFAP/EGFP MICE

Dzamba D.^{1,2}, Honsa P.^{1,2}, Valny M.², Rusnakova V.³, Kubista M.³, Chvatal A.², Anderova M.^{1,2}

¹2nd Medical Faculty, Charles University, Prague; ²Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague; ³Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague

Supervisor: Miroslava Anderova, PhD

Introduction: Despite the widespread expression of glutamate receptors in glial cells in different brain regions, they have been studied mostly in neurons. Thus, the role of glial glutamate receptors under physiological conditions as well as in pathological states, such as cerebral ischemia, is not fully understood.

Aims: The aim of this work was to elucidate the presence, composition and functioning of these receptors in GFAP-positive glial cells under physiological conditions and after focal cerebral ischemia.

Materials and Methods: We performed single cell RT-qPCR analysis of EGFP-positive cells isolated from the cortex of adult GFAP/EGFP mice. The analyzed cells were isolated and FACS-sorted from the uninjured brains of 50-day-old mice (control) and from mice 3, 7 and 14 days after middle cerebral artery occlusion (MCAo), a model of ischemic injury. For each cell, we analyzed the expression of genes for specific markers and individual subunits of glutamate receptors. NMDA receptors were further studied also by immunohistochemical analysis and Ca²⁺ imaging measurements.

Results: Gene expression profiling revealed that most of the analyzed astrocytes exhibited strong gene expression of glutamate receptor subunits, which was even increased after MCAo. The number of cells expressing the *Gria3* (AMPA receptor subunit GluA3) and *Grm5* (metabotropic glutamate receptor mGlu5) genes markedly increased following ischemia. Kohonen self-organizing map analysis divided all the collected cells into three subpopulations, distinct in their gene profile. Another interesting result concerned the gene *Grin3a* (NMDA receptor subunit GluN3A), which was also highly up-regulated after MCAo and correlates almost solely with polydendrocytic and not astrocytic markers. Presence of NMDA receptors in GFAP-positive glial cells was confirmed by immunohistochemical analysis. Ca²⁺ imaging functional study revealed that NMDA receptors in GFAP-positive glial cells become impermeable to Ca²⁺ after MCAo, probably due to involvement of GluN3A subunit.

Conclusions: There were numerous attempts to utilize antagonists of NMDA receptors in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease or stroke; however, most of them lead to intolerable side effects. One of the reasons is, in our opinion, strong focus on neuronal NMDA receptors while neglecting these receptors in glial cells. Our results bring new knowledge and help to unravel the role of glutamate receptors in glial cells especially after cerebral ischemia.

Support: GAUK 604212, GACR 309/08/1381

11. FEMOROACETABULÁRNÍ IMPINGEMENT SYNDROM – PREARTROSA KYČELNÍHO KLOUBU

Chládek P.

Ortopedická klinika UK – 2.LF, dětská a dospělá ortopedie a traumatologie, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Trč, CSc., MBA

Úvod: Femoroacetabulární impingement syndrom (dále jen FAI) patří k „mladým“ diagnosám a je na rozdíl od jiných významných kyčelních preartros (Vývojová dysplazie kyčelní, M.Perthes, Coxa vara adolescentium) znám a léčen teprve druhé desetiletí. S narůstající potřebou správné diagnostiky a léčby tohoto onemocnění vyvstává otázka přínosu jednotlivých diagnostických metod a léčebných postupů, přitom v přístupu k této diagnóze zdaleka nevládně konsensus.

Cíl: Účelem této přednášky je jednak popularisovat tuto relativně novou nosologickou jednotku, tedy seznámit s diagnostickými a terapeutickými možnostmi, jednak prezentovat soubor námi operovaných pacientů.

Materiál a metody: Naše zkušenosti vycházejí ze zhodnocení několika set pacientů, kteří byli na naší kliniku doporučení s koxalgii a suspekci na FAI, přitom větší část z nich byla dále vyšetřena podle obvyklého diagnostického algoritmu. U těchto pacientů bylo v období od září 2005 do října 2012 provedeno celkem 238 operací kyčelního kloubu pro výše uvedenou diagnózu, a to 110 řízenou kyčelní luxací (dále SHD), 45 operací pomocí předního nebo kombinovaného předního přístupu (dále AMIS) a 83 artroskopií kyčelního kloubu.

Zhodnotili jsme část souboru operovaných pacientů, a to pacienty operované pomocí SHD a AMIS. K hodnocení operačních výsledků jsme použili dvě schemata – WOMAC skóre a NAHS skóre, porovnali jsme hodnoty předoperační a pooperační. Dále jsme hodnotili přežívání kyčlí po těchto zachovných zákrocích bez nutnosti konverse na kloubní náhradu, vše s minimálně ročním odstupem.

Výsledky: Ve skupině pacientů operovaných pomocí SHD jsme zhodnotili výsledky 82 kyčelních kloubů u 71 pacientů. Dle srovnání předoperačního a pooperačního WOMAC skóre v této skupině došlo k průměrnému zlepšení o 22,2 bodů, u NAHS skóre došlo k průměrnému zlepšení o 15,5 bodů. Přežívání kyčlí pak bylo v této skupině 96,3 %. Ve skupině pacientů operovaných pomocí AMIS jsme zhodnotili výsledky 34 kyčelních kloubů u 33 pacientů. Dle srovnání předoperačního a pooperačního WOMAC skóre v této skupině došlo k průměrnému zlepšení o 13,4 bodů, u NAHS skóre došlo k průměrnému zlepšení o 14,2 bodů. Přežívání kyčlí pak bylo v této skupině 97,1 %.

Závěr: Na základě zhodnocení stupně a lokalisace vady, stupně artrosy v korelaci s věkem pacienta pak lze vybrat nejen vhodný léčebný postup, ale též v případě řešení chirurgického i vhodný přístup pro osteochondroplastiku hlavice, resp. acetabulární trimming.

12. DYNAMIKA A VÝVOJ PRELEUKEMICKÉHO KLONU U POMALU NASTUPOJÍCÍCH LEUKÉMIÍ

Zimmermannová O.^{1,2}, Hrušák O.^{1,2}, Froňková E.^{1,2}, Kubričanová Žaliová M.^{1,2}, Mejstříková E.^{1,2}, Mužíková K.^{1,2}, Zemanová Z.³, Malinová E.³, Starý J.², Zuna J.^{1,2}

¹CLIP – Childhood Leukemia Investigation Prague; ²Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK;

³Centrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD 1.LF UK

Školitel: Doc. MUDr. Jan Zuna, PhD.

Úvod: Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) se u 1-2% dětí manifestuje již před diagnózou obdobím iniciální pancytopenie a útlumu kostní dřeně následovaným spontánní tranzitní remisí.

Cíl: Naším cílem bylo sledovat vývoj budoucího leukemického klonu, dynamiku jeho velikosti a změny vedoucí k obrazu klinicky aktivní leukémie v prediagnostickém období.

Materiál a metody: Získali jsme vzorky z preleukemické fáze ALL od 5 pacientů, u nichž vlastní diagnóze předcházelo období anémie (1,4 - 6,1 měsíce). V kostní dřeni jsme kvantifikovali preleukemické buňky pomocí klonálně specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR) a analýzou leukemospecifických aberací metodami SNP array a FISH. Pro zpětnou detekci blastů v prediagnostických vzorcích byly použity různé přístupy – qPCR, FISH a next generation sequencing (NGS).

Výsledky: U všech pacientů (n=5) byly detekovány přestavby genů pro Ig/TCR pomocí qPCR v diagnostickém materiálu. Nejméně jeden preleukemický klon byl nalezen ve všech prediagnostických vzorcích (řádově v rozmezí 10⁻¹ až 10⁻⁶). U tří pacientů, s možností vyšetřit více než jeden preleukemický vzorek, jsme pozorovali překvapivou dynamiku ve velikosti aberantního klonu. Oproti očekávanému pozvolnému nárůstu jsme zaznamenali vysoké iniciální hladiny preleukemických buněk, následované dočasným výrazným poklesem v době 1 - 3 měsíce před diagnózou. Dva pacienti byli vyšetřeni metodou NGS. Získaná data korelovala s výsledky backtrackingu pomocí qPCR a přinesla podrobnější informace o spektru přestaveb a možném imunologickém pozadí progresu preleukémie v klinicky aktivní onemocnění. Vyšetření dále odhalilo významné zastoupení nemaligního T buněčného klonu s identickou přestavbou Vg9-Jg1.2, kterému je přisuzována role v antimikrobiální a protinádorové imunitě. Dynamika tohoto klonu navíc negativně korelovala s hladinami leukemických buněk.

U pacienta s ETV6/RUNX1 pozitivní leukémií jsme pomocí SNP array určili přídatné aberace a následně je analyzovali pomocí FISH. Jedna z aberací (delece 1p33) byla přítomna ve všech leukemických buňkách při diagnóze, zatímco 3 měsíce před diagnózou byl tento úsek deletován pouze u minoritního klonu buněk s přestavbou ETV6/RUNX1.

Závěr: Preleukemické buňky nejsou jen pomalu narůstajícím klonem, ale mají svou specifickou dynamiku. Ještě poměrně krátkou dobu před vlastním nástupem leukémie pak dochází ke klonálnímu vývoji či selekci leukemických buněk vedoucí k progresi do klinicky aktivního onemocnění.

Podpora projektu: IGA-MZ NT/12428-5, GAUK 618212

13. PROFILOVÁNÍ BUNĚK DĚTSKÉ AKUTNÍ LEUKEMIE POMOCÍ INOVATIVNÍ METODY AFINITNÍ PROTEOMIKY

Černá D.¹, Kanderová V.¹, Stuchlý J.¹, Fišer K.¹, Wu W.², Holm A.², Hrušák O.¹, Lund-Johansen F.², Kalina T.¹

¹CLIP-Cytometrie, Klinika dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol Praha; ²Department of Haematology, Rikshospitalet, Oslo

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Kalina, PhD.

Úvod: Akutní leukémie (AL) je nejčastější malignitou dětského věku charakteristická množstvím aberací na úrovni DNA, mRNA i proteinů. Současný výzkum leukemií je zaměřen převážně na sledování mutací na úrovni DNA, funkční důsledky těchto změn na buněčné úrovni však objasněny nejsou. Spojníkem mezi genovou expresí a buněčnou fyziologií jsou proteiny, proto se v současné době věnuje mnoho úsilí vývoji efektivnějších a senzitivnějších nástrojů, které mohou pomoci v hledání nových prognostických znaků na úrovni proteinů.

Cíl: Naším cílem je pomocí nové SEC-MAP technologie (Size-exclusion Chromatography - Microsphere-based Affinity Proteomics) zjistit míru exprese či aktivace (např. fosforylace) molekul diferenciatně exprimovaných v jednotlivých subtypech AL s ohledem na buněčný typ (B, T, myelo), genotyp (fúzní geny, aneuploidie) a časnou odpověď na léčbu detekovanou jako minimální reziduální nemoc (MRN).

Materiál a metody: SEC-MAP je soubor 1728 populací fluorescenčně značených latexových mikrokuliček, z nichž každá nese protilátky proti různým lidským proteinům. Z buněk izolujeme membránové, cytoplasmatické a jaderné proteiny pomocí detergentů, značíme je biotinem a rozdělujeme pomocí gelové chromatografie na 24 frakcí. Tyto následně inkubujeme s mikrokuličkami SEC-MAP a vazbu detekujeme pomocí fluorescenčně značeného streptavidinu na průtokovém cytometru.

Výsledky: Doposud jsme vyšetřili expresi cytoplasmatických (n=980) a membránových (a DNA-vazebných) (n=769) proteinů u 69 diagnostických vzorků AL. Díky schopnosti SEC-MAP rozlišit proteiny dle velikosti (hydrodynamického poloměru) jsme zjistili proteolýzu u 12 vzorků, které jsme následně z analýzy vyřadili. Analýzu výsledků jsme provedli pomocí automatického softwaru vytvořeném v R-project. Pro normalizaci dat proteinové exprese jsme použili normalizaci loess běžně používanou při mRNA expresním profilování. Takto jsme identifikovali 77 proteinů (např. SH2D1A, FAS, LAT, KIT, CD72) diferenciatně exprimovaných mezi jednotlivými kategoriemi AL. Zjistili jsme např. vyšší expresi cAMP-dependentní proteinkinázy PRKACA u TEL-AML1 pozitivních AL. V současné době data verifikujeme pomocí jiných proteomických metod, např. WB.

Závěr: Protože detekujeme nejen expresi proteinů, ale také jejich velikost, přítomnost v komplexu a lokalizaci v buňce, řadí se tak SEC-MAP k novým metodám funkční proteomiky kombinující kapacitu DNA microarrays a dostupnost průtokové cytometrie v „high-throughput“ hodnocení leukemických vzorků.

Podpora projektu: GAUK 596912, NT/13462, P302/12/G101, UNCE 204012

14. L-ASPARAGINÁZA OVLIVŇUJE BIOENERGETIKU LEUKEMICKÝCH BUNĚK

Heřmanová I.¹, Nůsková H.², Vališ K.³, Fišer K.¹, Trka J.¹, Starková J.¹

¹CLIP-Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha; ²Oddělení bioenergetiky, Fyziologický ústav AV ČR; ³Laboratoř charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologický ústav AV ČR.

Školitel: Júlia Starková

Úvod: Akutní lymfoblastická leukémie (ALL), nejčastější maligní onemocnění u dětí, je léčena kombinovanou chemoterapií, zahrnující L-asparaginázu (L-asp). L-asp depletuje extracelulární asparagin a glutamin. Na citlivosti leukemických buněk k L-asp se podílí jejich snížená schopnost syntézy asparaginu v porovnání s buňkami zdravými. Přesný mechanismus působení L-asp nebyl dosud objasněn.

Cíl: V naší práci jsme se zaměřili na studium následků deplece asparaginu a glutaminu v leukemických buňkách s cílem detailněji popsat cytotoxický efekt L-asp.

Materiál a metody: Použili jsme preB ALL buněčné linie REH a NALM6. Dlouhodobou inkubací s L-asp jsme vytvořili jejich protějšky rezistentní k L-asp. Stanovili jsme jejich genový expresní profil (GEP), který jsme porovnali s GEP pacientů s ALL se známou citlivostí k L-asp (Holleman, NEJM, 2004). Softwarem Metacore jsme analyzovali signální dráhy. Citlivost linií k inhibitorům jsme určili MTS testem. Expresi genů jsme změřili pomocí qRT-PCR, hladiny proteinů metodou Western Blot. Hladiny laktátu jsme změřili spektrofotometricky, buněčnou respiraci oxygrafem.

Výsledky: Analýza GEP a signálních drah odhalila, že L-asp ovlivňuje translaci a metabolismus leukemických buněk. Vztah k těmto drahám může souviset s glutaminázovým účinkem L-asp. Glutamin, významný zdroj energie nádorových buněk, aktivuje dráhu regulující translaci: PI3K/Akt/mTOR. Po podání L-asp došlo v REH a NALM6 k poklesu exprese proteinů klíčových pro aktivitu translace: Akt a fosforylované formy p70S6k. Testovali jsme vliv inhibitorů této dráhy na citlivost k L-asp. K nejvýraznějšímu zvýšení citlivosti k L-asp došlo po podání inhibitoru mTOR, jak u REH a NALM6, tak u rezistentních protějšků. Ve studiu vlivu L-asp na metabolismus jsme se nejdříve zaměřili na glykolýzu. Po podání L-asp došlo k poklesu hladiny proteinu c-myc (aktivátor glykolýzy) a glukózového transportéru 1. Hladina laktátu, hlavního produktu glykolýzy v nádorových buňkách, také klesla. L-asp způsobila v REH i NALM6 zvýšení endogenní respirace, která vypovídá o aktivitě oxidativní fosforylace (OXPHOS). OXPHOS zdravých lymfocytů nebyla inkubací s L-asp změněna.

Závěr: L-asp inhibuje dráhu mTOR, glykolýzu a aktivuje OXPHOS. Změny v energetickém metabolismu mohou být způsobeny snahou leukemických buněk doplnit depletované aminokyseliny z intracelulárních zdrojů pomocí B-oxidace a Krebsova cyklu. Domníváme se, že rezistence na L-asp je způsobena komplexní biochemickou adaptabilitou ke změnám v extracelulárním prostředí.

Podpora projektu: IGA NT1249, UNCE204012

15. QUANTITATIVE MR IMAGING AND SPECTROSCOPY OF BRAIN TUMORS

Malucelli A.^{1,2}, Wagnerová D.³, Herynek V.³, Dezortová M.³, Vymazal J.⁴, Urgošík D.⁵, Syrůček M.⁶, Jírů F.³, Škoch A.³, Bartoš R.^{1,2}, Sameš M.¹ and Hájek M.³.

¹Department of Neurosurgery, JE Purkyne University and Masaryk Hospital, Ústí nad Labem;

²International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital, Brno; ³MR-Unit, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague; ⁴Department of Radiology, Na Homolce Hospital, Prague;

⁵Department of Stereotactic and radiation neurosurgery, Na Homolce Hospital, Prague; ⁶Department of Pathology, Na Homolce Hospital, Prague.

Supervisor: Ing. Milan Hájek, DrSc.

Introduction: A quantitative analysis of different Magnetic Resonance (MR) parameters in patients with intracranial tumors is expected to provide a more reliable information about the nature and the extent of the pathology in comparison with subjective user-dependent evaluation. Correlation between MR spectroscopy (SI), diffusion and relaxation values based on quantitative pixel-by-pixel analysis has the potential to distinguish different histopathological entities – proliferating tumor, necrosis, edematous cerebral tissue, infiltrated cerebral tissue.

Aims: To evaluate the accuracy of quantitative multimodal MR imaging in neuro-oncological patients by correlating radiological data with histological findings and validate the use of these protocols in neurodiagnostical routine.

Materials and Methods: 43 patients with a cerebral expansive lesion were examined using a 3T MR imager. 55 healthy subjects served as a control group. In the patients group, 23 subjects had a newly-diagnosed brain lesion without any therapy in the past, 20 patients presented new lesions after first resection and chemo-radiotherapy. 36 lesions had histological verification, in the remaining 7 patients the definitive diagnosis of post-radiation changes was assessed according to radiological and clinical criteria (stabilization or reduction of the contrast-enhancement, no need for corticoids) after a follow-up of at least 6 months. SI data were analyzed with jSIPRO and LCModel, relaxation data with ViDi software, mean diffusivity (MD) with FSL. Correlations based on a pixel-by-pixel evaluation of two different MR parameters were performed by using the CORIMA program.

Results: Patterns of correlation between metabolite concentrations, MD and T2 relaxation times (T2) were found to be specific for different tumor histologies. Distinct areas of the correlation graph for Choline-MD and Choline-T2 seemed to correspond to specific tissue changes, i.e. normal brain tissue, proliferative tumor, brain tissue infiltrated by tumor cells with or without edema, necrosis. A specific MD-T2 pattern was found for High Grade Glioma, differentiating it from Low Grade and Lymphoma.

Conclusions: The correlation of different MR parameters on a pixel-by-pixel quantitative basis helps to describe the complexity of structural and biochemical changes caused in the brain tissue by the tumor growth. This may support the physician in the differential diagnosis of intracranial lesions and consent a more precise assessment of their extension.

Support: IGA MZCR NS/9654-4 and MZCR 00023001IKEM

16. CÉVNÍ PROTÉZY POKRYTÉ AUTOLOGNÍM ENDOTELEM V PRŮTOKOVÉM SYSTÉMU A V PRASEČÍM MODELU.

Chlupáč J.^{1,2}, Filová E.¹, Riedel T.³, Brynda E.³, Poledne R.⁴, Bačáková L.¹

¹Fyziologický ústav, Odd. biomateriálů a tkáňového inženýrství, AV ČR, v.v.i., Praha; ²Klinika transplantáční chirurgie, IKEM, Praha; ³Ústav makromolekulární chemie, AV ČR, v.v.i., Praha;

⁴Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, IKEM, Praha

Školitel: MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Úvod: Syntetické cévní protézy užívané v cévní chirurgii ve formě bypassu selhávají na podkladě trombózy a intimální hyperplázie. Experimentální i klinické nasazení endotelových buněk na lumenální povrch snižuje jejich trombogenicitu, avšak klinická relevance zvířecích modelů je omezená.

Cíl: Vytvořit klinicky relevantní model cévní protézy osazené endotelem v experimentu na prasati.

Materiál a metody: Na 5-ti prasatech byla testována chirurgická anatomie (iliko-femorální, aorto-ilický externí a aorto-ilický interní bypass) a na dalších 5-ti zvířatech bylo provedeno osazení endotelu. Autologní endotelové buňky byly odebrány z v.jugularis interna, namnoženy ve tkáňové kultuře, nasazeny na klinicky užívané cévní protézy (6 mm, PET - polyetylen tereftalát, VÚP, Brno, ČR) pomocí adhezivní vrstvy fibrin/fibronektin (Fb/FN) a vystaveny průtoku média. Endotelizovaný i kontrolní bypass byl implantován stejnému zvířeti. Průchodnost rekonstrukcí byla ověřena klinicky, angiograficky či sonograficky. Endotelová výstelka explantovaných protéz byla pozorována v konfokálním mikroskopu.

Výsledky: Průměrná doba in vitro procedury (odběr - implantace) trvala 50 ± 16 dnů. Průměrná denzita nasazení endotelu činila 60 tisíc buněk/cm². Dvě osazené protézy se uzavřely spolu s kontrolním bypasselem po 22 a 38 dnech, jedna trombozovala na podkladě sepse, jedna na podkladě chabého výtokového traktu a jedna zůstala průchodná 22 dnů, zatímco kontrolní bypass se uzavřel.

Závěr: Chirurgicky nejvhodnější model je oboustranný aorto-ilický interní bypass s podvazem zevních pánevních tepen. Miniprace je výhodnější než prase domácí. Endotelové buňky mohou kolonizovat PET cévní protézy pomocí adhezivního substrátu Fb/FN a zlepšit tak průchodnost bypassu na modelu miniprasete.

Uvedená práce v rámci kardiovaskulárního tkáňového inženýrství je první svého druhu v ČR a vyvinutý chirurgický model považujeme za klinicky relevantní a unikátní.

17. BEZPROSTŘEDNÍ VÝVOJ FUNKCE LEDVINNÉHO ŠTĚPU U DĚTÍ V ZÁVISLOSTI NA MNOŽSTVÍ TRANSPLANTOVANÉHO PARENCHYMU

Slavotínková M.¹, Chvátalová E.¹, Dlask K.², Špatenka J.³, Matoušovic K.^{3,4}, Seeman T.⁵

¹2. LF UK; ²Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní péče 2. LF UK a FN Motol; ³Transplantační centrum TC FN Motol; ⁴Interní klinika 2. LF UK a FN Motol; ⁵Pediatrická klinika 2. LF UK a FN Motol

Pregraduální student

Školitel: Primář MUDr. Jaroslav Špatenka, CSc.

Úvod: V naší předchozí studii (Foltynová E. et al., 2012) jsme prokázali, že dlouhodobá funkce ledviny transplantované (TPL) dětem nezávisí na množství TPL parenchymu, ale je detereminována pouze hmotností příjemce. Dosud nebyly publikovány studie, které by tento vztah objasnily v prvních hodinách a dnech po TPL.

Cíl: Posouzení rychlosti vývoje glomerulární filtrace (GFR) a sérového kreatininu (S-krea) bezprostředně po obnovení krevního průtoku štěpem.

Materiál a metody: Do retrospektivní studie jsme zařadili 48 dětských pacientů, kterým byla v rozmezí let 2004-2012 TPL ledvina ve FN Motol a u nichž byl nekomplikovaný potransplantační průběh. Všichni byli operováni standardní technikou. V souboru bylo 26 chlapců a 22 dívek, ve věkovém rozmezí 3,2- 18,8 roků, hmotnost příjemců byla v rozmezí 12,4 - 112 kg. Dárci byli ve věku 9 -52 roků, hmotnostního rozmezí 35-148 kg. Poměr hmotnosti dárce ku příjemci (index D/P) se pohyboval v rozmezí 0,85-5,64. Pacienty jsme rozdělili do dvou skupin dle indexu D/P <2,00 (sk. A) či > 2,00 (sk. B). V časovém odstupu 1,6,12,18,24,36,48,72,96,120,144 a 168 hodin jsme sledovali S-krea a z něj jsme vypočetli eGFR dle Schwartzovy rovnice a následně absolutní GFR. Na rychlost rozvoje funkce jsme usuzovali dle sklonu přímky vyjadřující vztah mezi časem a eGFR či 1/S-krea.

Výsledky: V časovém úseku do 48. hodiny eGFR stoupala ve skupině B dle rovnice přímky $y = 1,9857x + 15,78$, a ve skupině A dle rovnice $y = 0,6872x + 19,732$. V časovém úseku do 168. hodiny eGFR skupiny B stoupala dle rovnice $y = 0,3786x + 80,235$ a eGFR skupiny A dle rovnice $y = 0,3795x + 34,36$. Hodnoty 1/S-kreatininu v časovém úseku do 48. hodiny u skupiny A stoupaly dle rovnice $y = 0,00008x + 0,0021$ a hodnoty skupiny B stoupaly dle rovnice $y = 0,00040x + 0,0026$. V časovém úseku do 168. hodiny se hodnoty 1/S-kreatininu u skupiny A vyvíjely dle rovnice $y = 0,00004x + 0,0042$ a skupiny B dle rovnice $y = 0,00007 + 0,0139$. Ve 24. hodině činil medián eGFR skupiny A 28,54 ml/min/1,73m² a skupiny B 64,89 ml/min/1,73m². Vztah mezi absolutní GFR a hmotností dárce ve 24. hodině byl pozitivní a vyjádřen rovnicí $y = 0,4215x + 7,6$.

Závěr: Za 48 hodin po TPL došlo ve skupině B k rychlejšímu rozvoji renálních funkcí než ve skupině A. Ve 24. hodině po TPL byla ve skupině B výrazně vyšší eGFR. Usuzujeme, že TPL většího množství ledvinového parenchymu vede k rychlejšímu nástupu funkce v přímém vztahu k hmotnosti dárce. V období do 168 hodiny se funkce u obou skupin vyrovnávají, což koresponduje s naší dřívější studií.

Podpora projektu: Grant IGA NT 11081

18. PROTEINURIE U DĚTÍ PO TRANSPLANTACI LEDVINY A JEJÍ VZTAH K PŘEŽÍVÁNÍ TRANSPLANTOVANÝCH LEDVIN.

Rosík T., Seeman T.

Pediatrická klinika FN Motol Praha

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Seeman, CSc.

Úvod: U dospělých pacientů po transplantaci ledviny byl prokázán vliv proteinurie na selhání štěpů i úmrtí pacientů. U dětí po transplantaci ledviny je proteinurie také častou komplikací, její vztah k přežívání transplantovaných ledvin však zatím nebyl vyšetřován.

Cíl: Cílem studie bylo posoudit vliv proteinurie a dalších faktorů na přežívání štěpů u dětských pacientů transplantovaných ve FN Motol v letech 1997-2007.

Materiál a metody: Ve FNM byla v letech 1997-2007 provedena transplantace ledviny u 91 pacientů. Ze souboru bylo vyloučeno 16 pacientů (2 z důvodu rekurence fokálně-segmentální glomerulosklerózy ve štěpu, 3 z důvodu selhání štěpu do 1 roku po transplantaci, 10 z důvodu neúplných informací v dokumentaci). U pacientů byla získána v pravidelných ročních intervalech data o proteinurii, krevním tlaku, glomerulární filtraci, na konci sledování pak navíc údaje o selhání štěpu, akutní nebo chronické rejekci a nerejekčních komplikacích, o imunosupresivní a antihypertenzní medikaci. Byla též analyzována demografická data a výsledky všech biopsií u všech pacientů provedené ve sledovaném období.

Výsledky: Bylo analyzováno 75 pacientů, z toho 40 chlapců a 35 dívek, průměrná doba na dialýze před transplantací byla 356 dnů (rozmezí 0 – 1621 dnů), průměrný věk příjemce byl 12,1 let (rozmezí 2,1 – 17,9 let), průměrný věk dárce 31 let (rozmezí 7 – 57 let), průměrná doba sledování po transplantaci byla 5,5 let (rozmezí 1,5 – 12,9 let). Patologická proteinurie v prvním roce po transplantaci vyjádřena jako index celková bílkovina/kreatinin byla stanovena ≥ 30 mg/mmol. Ve skupině s proteinurií < 30 mg/mmol v prvním roce po transplantaci bylo 49 dětí, průměrná proteinurie 17,52 mg/mmol. Ve skupině s proteinurií ≥ 30 mg/mmol v prvním roce po transplantaci bylo 26 dětí, průměrná proteinurie 59,77 mg/mmol. Bylo prokázáno statisticky výrazně snížené přežívání štěpů ve skupině s proteinurií ≥ 30 mg/mmol 1 rok po transplantaci 31% (8 ze 26 dětí) oproti 0% (0 ze 49 dětí) ve skupině s proteinurií < 30 mg/mmol ($p < 0,0001$). Jako rizikový faktor pro snížené přežívání štěpu byla prokázána přítomnost jak akutní rejekce HR (95% CI) 22.83 (2.81-185.64), $p = 0.003$, tak i kortikorezistentní rejekce HR (95% CI) 5.49 (1.31-23.07) $p = 0.02$.

Závěr: Zvýšená proteinurie 1 rok po transplantaci ledviny je spojena se sníženým přežíváním štěpů. Jako další rizikový faktor na přežívání štěpu byla prokázána přítomnost akutní rejekce a kortikorezistentní rejekce.

Podpora projektu: Institucionální financování FNM, č. 6001/06.

19. KVALITA ŽIVOTA A NEMOCNOST DĚTÍ PO OPERACI VROZENÉ BRÁNIČNÍ KÝLY

Rounová P.¹, Zemková D.², Šulc J.², Pýcha K.¹, Straňák Z.³, Svobodová T.², Kynčl M.⁴, Šnajdauf J.¹, Rygl M.¹

¹Klinika dětské chirurgie FNM Praha; ²Pediatrická klinika FNM Praha; ³Pediatric, Ústav pro péči o matku a dítě, Praha; ⁴Klinika zobrazovacích metod FNM Praha

Školitel: doc. MUDr. Michal Rygl, Ph.D.

Úvod: Rozvoj prenatální diagnostiky a léčby, vývoj ventilačních technik a strategie odloženého chirurgického výkonu na stabilním novorozenci přispěly k poklesu mortality u dětí s vrozenou brániční kýlou (congenital diaphragmatic hernia, CDH). Do popředí zájmu se dostávají otázky dlouhodobé morbidity a kvality života přežívajících novorozenců s CDH.

Cíl: Cílem práce je posouzení zdravotního stavu a kvality života u dětí operovaných po narození pro vrozenou brániční kýlu.

Materiál a metody: Retrospektivně-prospektivní studie zaměřená na zdravotní stav a kvalitu života dětí operovaných v letech 1997–2009 pro CDH. Analyzovaná data byla získána ze zdravotnické dokumentace, dotazníků vyplněných rodiči a klinického vyšetření u 57 dětí po operaci CDH (33 chlapců, 24 dívek), průměrný věk v době vyšetření byl 6,5 roku (11 měsíců až 14,5 roku).

Výsledky: Celkovou kvalitu života rodiče hodnotí jako dobrou u 43 dětí (77%), uspokojivou u 11 dětí (20%), málo uspokojivou u 2 dětí (3%). Žádný z rodičů nehodnotil kvalitu života dítěte jako špatnou. Respirační obtíže udává 17 dětí (30%), astma má potvrzeno 6 pacientů (11%). Klinické projevy mírného gastroezofageálního refluxu jsme zaznamenali u 15 dětí (26%), sonograficky byl zastižen u 16 dětí (28%). Fundoplikace dle Nissena byla provedena u 2 pacientů (4%). Nespecifické zažívací obtíže se vyskytují u 25% dětí. Skolióza byla nalezena u 5%, vadné držení těla u 33% a vpáčený hrudník u 42% pacientů. Ve srovnání se zdravou populací mají děti po operaci CDH signifikantně nižší SD skóre tělesné výšky (průměr -0,39, $p < 0,05$), nižší SD skóre tělesné hmotnosti (průměr -0,75, $p < 0,001$) a nižší SD skóre body mass indexu, BMI (průměr -0,68, $p < 0,001$). Neurologické obtíže provází 16 dětí (28%). Nejčastěji se jedná o opoždění psychomotorického vývoje (81%), zejm. v prvních měsících života, které se u převážné většiny pacientů v průběhu prvních let života normalizuje. Sociální adaptace se hodnotila u 33 starších dětí (průměrný věk 9,7 roku). 30 dětí (91%) navštěvuje základní školu, 2 děti speciální základní školu, jedno dítě je ve speciální mateřské školce. 27 dětí (82%) z celkového počtu 33 dětí závodně sportuje nebo se bez problému účastní tělocviku.

Závěr: Celkové přežití našich pacientů 77% je srovnatelné se zahraničními studiemi, což je dáno komplexní péčí o tyto pacienty ve FN Motol. Přes větší incidenci přidružených onemocnění u dětí po operaci CDH oproti zdravé populaci hodnotíme celkově zdravotní stav těchto pacientů jako příznivý a rodiče považují kvalitu života svých dětí za dobrou.

20. SOMATOGNOSTICKÉ FUNKCE A PROSTOROVÁ PAMĚŤ U PACIENTŮ S FAILED BACK SURGERY SYNDROME

Lepšíková M., Křikavová A., Kolář P.

Klinika rehabilitace a TVL 2. LF UK FN v Motole, Praha

Školitel: prof. PaedDr. Pavel Kolář PhD

Úvod: Failed back surgery syndrome (FBSS) jakožto multifaktoriální chronický bolestivý stav má významný dopad na jedince a celou společnost a představuje velký zdravotnicko-medicínský problém, jehož vyústěním je často pracovní neschopnost a invalidita. Všeobecně se hovoří o 10-20% neúspěšných operací páteře s následkem FBSS.

Cíl: Cílem práce bylo porovnat kvalitu somatognostických funkcí a prostorovou orientaci bez zrakové kontroly u pacientů s FBSS a zdravých jedinců a tím přispět k diskusi, zda jsou tyto funkce porušené u jedinců s chronickou bolestí.

Materiál a metody: 30 pacientů (průměrný věk 51 let, Me=51) s diagnózou FBSS a 25 probandů kontrolní skupiny (průměrný věk 47 let (Me=47) bylo vyšetřováno testem prostorové orientace v laboratoři prostorové kognice Blue Velvet Arena. Dále byly provedeny čtyři testy na vyšetření somatognózie, a to test polohocitu horních končetin a test vnímání tělesných rozměrů, každý test byl vyšetřen ve dvou variantách. Ve skupině pacientů jsme hodnotili rovněž míru závislosti somatognózie na věku, době trvání bolesti, počtu operací a míře pohybové aktivity.

Výsledky: Prokázali jsme signifikantní rozdíly mezi skupinou pacientů a kontrolní skupinou v testu prostorové orientace, kde větší přesnost odhadu byla překvapivě zjištěna u skupiny pacientů. Skupina pacientů vykazovala ve všech testech somatognózie horší výsledky oproti skupině kontrolní, avšak signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pouze v jednom ze čtyř testů. Prokázali jsme silnou závislost kvality somatognostických funkcí na věku, době trvání bolesti a míře pohybové aktivity.

Závěr: U pacientů s FBSS byla zjištěna horší kvalita somatognostických funkcí v porovnání s kontrolní skupinou. Potvrdil se tedy náš předpoklad, že tělesné schéma je zhoršené v přítomnosti chronické bolesti. Nemůžeme však s jistotou říci, co je příčina a co následek. Nicméně se domníváme, že identifikace poruch somatognostických funkcí v rámci komplexního vyšetření má u pacientů s FBSS, ale i u ostatních pacientů s chronickými bolestivými poruchami pohybového aparátu, klíčový diagnostický a terapeutický význam.

21. VYUŽITÍ NOVÝCH MOLEKULÁRNÍCH METOD V DIAGNOSTICE VROZENÝCH IMUNODEFICITŮ

Svatoň M.¹, Šedivá A.², Mejstříková E.¹, Keslová P.¹, Kalina T.¹, Kotrová M.¹, Vinohradská H.³, Votava F.⁴, Klocperk A.², Froňková E.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha; ²Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol, Praha; ³Oddělení klinické biochemie LF MU a FN Brno; ⁴Klinika dětí a dorostu 3. LF UK a FNKV, Praha

Pregraduální student

Školitel: MUDr. Eva Froňková, Ph.D.

Úvod: Během přestavby genů pro T-buněčné receptory a imunoglobuliny je DNA mezi jednotlivými segmenty vystřižena ve formě tzv. excizního kroužku – TREC (T-cell Receptor Excision Circle) a KREC (Kappa-deleting Recombination Excision Circle) a dále se nereplikuje při dělení buňky. Stanovení koncentrace těchto excizních kroužků tak může sloužit jako dobrý znak vývoje lymfocytů.

Cíl: Cílem našeho projektu bylo optimalizovat tuto metodu a ověřit její použitelnost na vzorcích neonatálních screeningových (Guthrieho) karet zdravých dětí a dětí, které byly diagnostikovány s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID). Vzhledem k nutnosti velmi rychlého potvrzení diagnózy u tohoto onemocnění jsme použitelnost této metody ověřovali také na vzorcích periferní krve pacientů s podezřením na závažnou poruchu imunity s cílem stanovit hranice fyziologických hodnot TREC a KREC.

Materiál a metody: Pomocí kvantitativní PCR jsme vyšetřili DNA izolovanou z Guthrieho karet 59 zdravých dětí a 11 dětí s onemocněním SCID narozených v letech 2001 – 2012. Dále jsme prospektivně vyšetřili DNA izolovanou z periferní krve 7 pacientů s podezřením na poruchu imunity, 1 pacienta s diagnózou X-vázané agamaglobulinémie (XLA), 19 pacientů s DiGeorgovým syndromem a 6 kontrolních pacientů. Ve vzorcích jsme stanovili koncentraci TREC, KREC a kontrolního genu pro albumin ve třech samostatných qPCR reakcích. Výsledky jednotlivých pacientů jsme normalizovali podle koncentrace kontrolního genu ve vzorcích.

Výsledky: U pacientů s diagnózou SCID jsme prokázali hodnoty TREC minimálně o 2 řády nižší než u zdravých novorozenců; u většiny byla koncentrace TREC nulová. Hodnoty KREC odpovídaly zdravým novorozencům u onemocnění SCID s fenotypem T-B+ a byly nulové u pacientů s fenotypem T-B-. U pacienta s XLA byly hodnoty KREC nulové. Hodnoty TREC a KREC u kontrolních vzorků periferní krve byly srovnatelné s výsledky z Guthrieho karet. U jednoho z prospektivně vyšetřených pacientů byla na základě klinického vyšetření, nulových hodnot TREC a ověření výsledku průtokovou cytometrií indikována transplantace hematopoetických buněk.

U pacientů s DiGeorgovým syndromem jsme postnatálně překvapivě našli normální hladiny TREC/KREC, což naznačuje kompenzaci vývoje T-lymfocytů i při chybějícím thymu.

Závěr: Metoda stanovení hodnot TREC a KREC je nenáročná, levná a informativní metoda, která umožňuje urychlit diagnostiku závažných poruch imunity, které vyžadují včasnou terapii, a to i postnatálně z periferní krve.

Podpora projektu: Práce byla podpořena společností Baxter

22. KLINICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ REGULAČNÍCH T LYMFOCYTŮ V PERIFERNÍ KRVI U OVARIÁLNÍCH KARCINOMŮ

Brtnický T.¹, Fialová A.², Laštovička J.², Rob L.¹, Špíšek R.²

¹Gynekologicko-porodnická klinika FNM a 2.LF UK; ²Ústav imunologie FNM a 2.LF UK

Školitel: prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc.

Úvod: V současné době se 75-80 % karcinomů ovarii diagnostikuje v pozdních stádiích, tj. ve stadiu III. a IV. (FIGO klasifikace). U řady nádorů bylo navrženo vyšetření regulačních T lymfocytů (Treg) v perif. krvi, jako prognostického markeru progresu onemocnění. Vyšší hladiny jsou nepříznivým faktorem. Jednou z možností jak snížit množství T reg v perif. krvi je podání metronomických dávek některých cytostatik. V této studii jsme vyhodnocovali význam stanovení Treg v perif. krvi u pacientek, které dostávaly v rámci konsolidační terapie pro karcinom ovária cyklofosamid (CFA), resp. etoposid

Cíl: 1. Ověřit, zda procento Treg v periferní krvi koreluje s prognózou pacientů u zhoubných nádorů ovarii. Zhodnotit klinickou využitelnost množství Treg v periferní krvi jako další prognostický faktor vývoje onemocnění.
2. Porovnat účinek jednotlivých chemoterapeutik v metronomických dávkách (CFA, etoposid) na množství Treg. Otestovat efekt konsolidační léčby na progression free survival (PFS) a imunologicky relevantní parametry a CA125

Materiál a metody: Sledovali jsme celkem 5 skupin pacientek (A,B,C,D,E). Pacientky zařazené do studie podstoupily radikální operaci, 6-8 cyklů kombinované chemoterapie (taxany+platina), a pacientky ve skupinách A a B následně konsolidační terapii. V průběhu studie bylo každé pacientce provedeno celkem 10 odběrů perif. krve a stanoven počet Treg pomocí průtokové cytometrie a CA125

Výsledky: Do studie bylo zařazeno 46 pacientek s epitel. ovar. karcinomem. Pacientky s pozdní recidivou karcinomu ovária (>12 měs. po skončení prim. chemoterapie) mají signifikantně více Treg 4 týdny po ukončení prim. chemoterapie ($p < 0,01$). Pacientky s časnou recidivou mají signifikantně vyšší hodnoty CA125 od 7. měření ($p < 0,01$). Skupiny s konsolidační terapií a bez ní se neliší signifikantně v počtu recidiv. Pacientky s časnou recidivou mají signifikantně větší slope křivky růstu Treg, tedy u nich dochází k rychlejšímu nárůstu Treg v krvi. Podávání konsolidační terapie nevedlo ke snížení počtu Treg v perif. krvi

Závěr: Z výsledků studie vyplývá, že nejsilnějším protektivním faktorem pro recidivu onemocnění je radikalita provedené operace, tzn. nepřítomnost nádorového rezidua. Z hodnocených parametrů vyplývá, že konsolidační terapie nemají vliv na PFS, metronomické dávky CFA resp. etoposidu neovlivňují počet Treg v perif. krvi. Bylo prokázáno, že Treg a CA125 signifikantně stoupají s progresí onemocnění. Stanovení hladiny Treg z perif. krve má limitovanou výpovědní hodnotu pro predikci dalšího vývoje onemocnění

Podpora projektu: Grant GAUK 63310/2010

23. CHARAKTERIZACE PODPOPULACÍ CMV SPECIFICKÝCH T-LYMFOCYTŮ PŘI IMUNITNÍ REKONSTITUCI PO TRANSPLANTACI KOSTNÍ DŘENĚ

Stuchlý J.¹, Pelák O.², Król L.¹, Keslová P.¹, Hubáček P.¹, Sedláček P.³, Starý J.¹, Hrušák O.^{1,2}, Kalina T.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a Fakultní nemocnice Motol; ²CLIP, Childhood Leukemia Investigation Prague; ³Klinika dětské hematologie a onkologie - transplantační jednotka UK 2.LF a Fakultní nemocnice Motol

Školitel: doc. MUDr. Tomáš Kalina, Ph.D.

Úvod: Deplece buněčné imunity před allogenní transplantací kostní dřeně vede často k reaktivaci cytomegalvirové (CMV) infekce, která může vést k život ohrožující CMV-nemoci a vyžaduje včasnou terapii.

Cíl: Naším cílem je charakterizovat dynamiku a kinetiku imunitní rekonstituce vzhledem ke kontrole CMV-reaktivací. Dokonalejší porozumění rekonstituci specifické obranyschopnosti potenciálně umožní úpravu protokolů antivirové léčby a omezí nežádoucí vedlejší účinky na pacienta.

Materiál a metody: Vyšetřili jsme ex vivo odpověď CMV-specifických CD4+ a CD8+ T-lymfocytů na CMV antigen (směs totálního lyzátu CMV, peptidu pp65 a peptidu IE-1) 609 vzorků od 199 pacientů. Spektrum pacientů zahrnuje jak pacienty s vysokou virovou náloží (virová nálož byla detekována polymerázovou řetězovou reakcí), tak pacienty s nedetekovatelnou virémií včetně pacientů, kteří reaktivaci neprodělali. Pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie jsme stanovili funkční status T-buněčných podpopulací. Měřili jsme expresi aktivačního markeru CD154, intracelulárních cytokinů (IFN γ , IL2) a degranulačního markeru CD107a.

Výsledky: Popsali jsme funkční změny T-buněčného profilu během imunitní rekonstituce v souvislosti s reaktivací CMV a jeho kontroly. Naše výsledky ukazují, že zastoupení CD8+ T-lymfocytů schopných produkce obou měřených cytokinů (IFN γ , IL2) je výrazně vyšší u pacientů kontrolujících reaktivaci (průměrně 0.33%, SD=0.4%) ve srovnání s pacienty, kteří reaktivaci nekontrolují. CD8+ T-lymfocyty schopné produkce pouze IFN γ jsou nejzastoupenější podpopulací jak u pacientů kontrolujících tak nekontrolujících.

Pomocí hierarchického clusterování jsme prokázali, že zastoupení polyfunkčních CD8+ T-lymfocytů koreluje se zastoupením ostatních podpopulací. CD8+ T-lymfocyty schopné produkce pouze IFN γ vystupují v této analýze izolovaně, což naznačuje nedostatek spolupráce s ostatními podpopulacemi.

Závěr: Naše studie popsala funkční charakteristiky a vývoj specifických T-lymfocytů během imunitní rekonstituce po transplantaci kostní dřeně. Umožnila lepší porozumění kinetice a dynamice imunitní odpovědi při reaktivaci CMV a potvrdila, že detailní cytometrické vyšetření umožní odhalit markery s předpovědní hodnotou pro další léčbu.

Podpora projektu: GAUK 2120149-643912, IGA grant NT 13271-4

24. DYNAMIKA PROTINÁDOROVÉ IMUNITNÍ ODPOVĚDI U KARCINOMU OVARIA

Partlová S.¹, Sojka L.¹, Fučíková J.¹, Rob L.², Brtnický T.², Bartůňková J.¹, Špíšek R.¹, Fialová A.¹
¹Ústav imunologie UK 2.LF a FN Motol, Praha; ²Gynekologicko-porodnická klinika UK 2.LF a FN Motol, Praha

Školitel: prof. MUDr. Radek Špíšek, Ph.D.

Úvod: Karcinom ovaria je jedním z nejčastějších gynekologických nádorových onemocnění, vyznačující se špatnou prognózou a vysokou mortalitou, přičemž špatná prognóza je dána především absencí závažnějších symptomů v raných stádiích onemocnění. Přítomnost buněk imunitního systému v nádorové tkáni má významný vliv na prognózu onemocnění. Přesto dosud existuje velmi málo údajů o dynamice protinádorové imunitní reakce v nádorové tkáni během progresu onemocnění.

Cíl: V našem projektu jsme studovali charakteristiku infiltrátu buněk imunitního systému v nádorové tkáni pacientek s karcinomem ovaria v různých stádiích onemocnění a zároveň jsme sledovali zastoupení těchto buněk v periferní krvi pacientek.

Materiál a metody: Pomocí průtokové cytometrie jsme analyzovali zastoupení jednotlivých populací T lymfocytů v nádorové tkáni a periferní krvi u 44 nově diagnostikovaných pacientek s karcinomem ovaria. Abychom zjistili, zda nádor infiltrující regulační T lymfocyty (Treg) vznikají in situ, nebo jsou do místa nádoru atrahovány z periferie, měřili jsme koncentraci chemokinu CCL22 v supernatantech buněk nádorové tkáně. Zároveň jsme analýzou na průtokovém cytometru měřili na regulačních T lymfocytech povrchovou expresi CCR4, receptoru pro chemokin CCL22.

Výsledky: Zjistili jsme, že časná stádia onemocnění jsou charakterizována zvýšeným počtem Th17 lymfocytů, zatímco ve stádiu II byl pozorován narůstající počet Th1 buněk. V pokročilých stádiích onemocnění bylo detekováno výrazné zastoupení funkčních Helios+ regulačních T lymfocytů, spolu se zvýšeným výskytem makrofágů a myeloidních dendritických buněk. Dále jsme analýzou cytokinového a chemokinového profilu zjistili pozitivní korelaci počtu Tregů s produkcí chemokinu CCL22, který je znám jako chemokin atrahující Tregy. Abychom podpořili naši hypotézu, že jsou Tregy aktivně rekrutovány do místa nádoru, měřili jsme expresi CCR4. Detekovali jsme výrazně nižší expresi CCR4 u Tregů izolovaných z nádorové tkáně, v porovnání s cirkulujícími regulačními T lymfocyty. Zjistili jsme, že produkce CCL22 nádorovými buňkami byla výrazně zvýšena po stimulaci IFN γ .

Závěr: Souhrnně lze říci, že v průběhu progresu karcinomu ovaria dochází ke snížení prozánětlivé Th17 a Th1 imunitní odpovědi a ke specifické migraci regulačních T lymfocytů do nádorové tkáně. Migrace je mediována chemokinem CCL22, který je v zánětlivém prostředí produkován nádorovými buňkami. Tento proces vede v pokročilých stádiích karcinomu ovaria k silné imunosupresi v nádorovém mikroprostředí.

Podpora projektu: GAUK 3654/2011; GAUK 5734/201

POSTERY

P-01. VLIV DELECE α -SYNTROFINU NA OBJEMOVÉ ZMĚNY ASTROCYTŮ V PRŮBĚHU PATOLOGICKÝCH PODMÍNEK IN SITU

Turečková J.^{1,2}, Mikešová M.¹, Anděrová M.¹

¹Oddělení buněčné neurofyziologie, Ústav experimentální medicíny, AV ČR Praha; ²2. lékařská fakulta UK Praha

Školitel: Ing. Miroslava Anděrová, CSc.

Úvod: Mozkový edém doprovází řadu onemocnění a úrazů mozku a bývá nejčastější příčinou úmrtí pacientů. Na tvorbě mozkového edému se zásadně podílí astrocyty, jejichž základní funkcí za patologických podmínek je vylučování nadbytečných iontů a neuropřenašečů z extracelulárního prostoru. Zvýšená koncentrace osmoticky aktivních iontů a neuropřenašečů uvnitř astrocytů je doprovázena vtokem vody přes specifické kanály – aquaporiny (AQP), což vede ke zvětšování buněčného objemu. Hlavním aquaporinem CNS je AQP4, který je exprimován především v endymových buňkách a astrocytech. Za ukotvení AQPů v buněčných membránách zodpovídá tzv. proteinový membránový komplex spojený s dystrofinem (angl. dystrophin-associated protein complex; DAP), jehož součástí je vždy jeden z rodiny tzv. syntrofinů. Tkáňová specifita komplexu je závislá na typu syntrofinu, přičemž za exprese AQP4 na perivaskulárních membránách astrocytů je zodpovědný α -syntrofin. Z tohoto důvodu lze pomocí delece genu pro α -syntrofin specificky studovat funkci AQP4 lokalizovaných pouze na membránách astrocytů, které jsou v kontaktu s krevním řečištěm v mozku.

Cíl: Cílem práce je s pomocí metody konfokální 3D morfometrie popsat vliv delece α -syntrofinu na objemové změny kortikálních astrocytů za patologických podmínek modelovaných in situ.

Materiál a metody: Byly zkříženy dva druhy transgenních myší: 1) s delecí genu pro α -syntrofin a 2) s fluorescenčně označenými astrocyty. U kříženců byly s pomocí metody konfokální 3D morfometrie kvantifikovány změny objemu kortikálních astrocytů v průběhu aplikace roztoků modelujících hypo-, hyper-osmotický stres, deprivaci kyslíkem a glukózou (angl. oxygen-glucose deprivation, OGD) a za zvýšené extracelulární koncentrace K⁺.

Výsledky: Bylo zjištěno, že delece genu pro α -syntrofin ovlivňuje jak časový průběh objemových změn astrocytů za patologických podmínek, tak i schopnost astrocytů regulovat svůj objem. V průběhu hypoosmotického stresu, OGD nebo za zvýšené koncentrace K⁺ docházelo k menšímu nárůstu objemu u astrocytů s absencí α -syntrofinu. Kromě toho se ukázalo, že v průběhu reperfuse následující po hyperosmotickém stresu dochází u astrocytů s absencí α -syntrofinu k rychlejšímu návratu k původnímu objemu.

Závěr: Tato práce přispívá k popsání mechanismů vedoucích k objemovým změnám astrocytů za patologických podmínek. Pochopení těchto mechanismů může dopomoci k rozvoji nových profylaktických a terapeutických metod při léčbě mozkového edému, který je komplikujícím faktorem řady neurologických onemocnění.

P-02. ADOPTIVNÍ TRANSFER TUMOR SPECIFICKÝCH LYMFOCYTŮ V LÉČBĚ PACIENTŮ S KARCINOMEM PROSTATY

Vávrová K.¹, Žůrková K.², Horváth R.¹, Bartůňková J.¹

¹Ústav imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy & Fakultní nemocnice V Motole, Praha;

²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Školitel: prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc.

Úvod: Adoptivní transfer tumor specifických T lymfocytů (Adoptive cell transfer, ACT) je slibnou imunoterapeutickou strategií využívanou k indukci protinádorové odpovědi u pacientů s onkologickým onemocněním. Metoda je založena na ex vivo expanzi tumor specifických T lymfocytů s následným podáním zpět pacientovi.

Cíl: Cílem projektu je vyvinout a optimalizovat protokol výroby autologních tumor specifických T lymfocytů pomocí vakcíny z dendritických buněk vhodný pro adoptivní transfer pacientům s karcinodem prostaty.

Materiál a metody: Expanze lymfocytů probíhá v podmínkách ex vivo, za pomoci autologní vakcíny na bázi dendritických buněk, která je pulzovaná prostatickou nádorovou linií LNCap. T lymfocyty dárce se ko-kultivují s autologní vakcínou, čímž se indukuje tvorba tumor specifických lymfocytů. Tyto preinkubované lymfocyty se následně stimulují pomocí magnetických kuliček Dynabeads (anti-CD3/anti-CD28) a dále expandují ve WAVE bioreaktoru, který zajistí optimální kultivační podmínky a namnožení specifických lymfocytů na požadované množství. Ve finálním produktu stanovujeme frekvenci a fenotypový profil tumor specifických T lymfocytů.

Výsledky: Frekvence tumor specifických T lymfocytů ve finálním produktu v průměru odpovídala 3% u CD8+IFNg+ a 19,3% u CD4+IFNg+. Analýza také prokázala, že tyto lymfocyty exprimují molekuly CD27 a CD28, ale zároveň neexprimují znak CD57. Tento profil odpovídá tzv. early/intermediate fenotypu, který se jeví jako nejučinnější pro účely adoptivního transferu. Viabilita pěstovaných lymfocytů byla více než 95%. Expanzí ve WAVE bioreaktoru jsme dosáhli nejvyššího celkového počtu $1,42 \times 10^9$ lymfocytů.

Závěr: Experimenty byly provedeny na modelu zdravých dárců (n= 4) v běžných laboratorních podmínkách, v budoucnu plánujeme adjustaci protokolu na podmínky správné klinické praxe (GMP), která umožní podání produktu pacientům s karcinodem prostaty. Předpokládáme, že kombinovaná terapie vakcíny a ACT povede ke zvýšení protinádorových imunitních odpovědí a přispěje k účinnější léčbě pacientů.

Podpora projektu: Projekt je podporován granty IGA MZ 11559-5 a IGA NT 12402-5.

P-03. 3D REKONSTRUKCE ČELISTNÍHO KLOUBU PO RESEKCI Z DŮVODU CYTY, ANALÝZY NAPĚTÍ A DEFORMACE

Mahdian N.¹, Dostálová T.¹, Daněk J.², Nedoma J.³, Kohout J.⁴, Hlišáková P.¹

¹Stomatologická klinika dětí a dospělých 2.LF a FN v Motole, oddělení maxillofaciální chirurgie;

²Katedra matematiky Západočeské univerzity v Plzni; ³Ústav informatiky akademie věd ČR; ⁴Katedra informatiky a výpočetní techniky Západočeské univerzity v Plzni

Školitel: Prof. MUDr. Tatjana Dostálová, Dr.Sc., MBA

Úvod: S rozvojem zobrazovacím metod a počítačových technologií začíná mít v medicínských oborech matematické modelování čím dál větší úlohu. Může být velmi přínosný pro lepší pochopení biomechaniky při zatěžování kostí, kloubů a dalších tkáních. Toto platí jak pro zdravou tkáň, tak pro osleбенou či tkáň nahrazenou jiným materiálem – například protézou.

Cíl: Cílem této práce je 3D analýza temporomandibulárního kloubu (dále jen TMK) u pacientky, která podstoupila operaci, během níž jí byla resekována větev mandibuly spolu s částí těla a exartikulací vpravo pro přítomnost rozsáhlé cysty a tento defekt byl zrekonstruován subtotální kloubní náhradou.

Materiál a metody: Zaměřili jsme se na získání matematického modelu, který by adekvátně popisoval změny, jenž nastaly v TMK po operaci. Data pro vytvoření 3D matematického modelu byly převzaty ze zhotovených CT a numerické výsledky jsou založeny na teorii semi-koercivního jednostranného kontaktního problému v lineární elasticitě.

Výsledky: Z výsledků jasně vyplývá, že u pacientky došlo po operaci ke změnám rozvržení sil během žvýkání na straně , kde byl kloub rekonstruovaný subtotální protézou. Také se potvrdil náš předpoklad, že protože je TMK bilaterálním kloubem, působí změny na jedné straně i na stranu druhou.

Závěr: Terapie u pacientky byla úspěšná, nicméně díky 3D matematickému modelování jsme schopni s poměrně velkou přesností určit, kde po operaci dochází k největšímu zatížení a určit tak předlekční místa možných budoucích komplikací a to jak na straně, kde je implantována protéza, ale také na straně kde je kloub neoperovaný.

P-04. INFANTILNÍ HEMANGIOM – PDL LASER VERSUS CHIRURGICKÁ TERAPIE

Michalusová I.¹, Remlová E.², Dostálová T.¹, Jelínková H.³, Vránová J.^{3,4}, Hubáček M.¹

¹Dětská stomatologická klinika dětí a dospělých 2.LF UK a FN v Motole; ²AVE laserové centrum, Olomouc; ³Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra fyzikální elektroniky ČVUT v Praze;

⁴Katedra lékařské biofyziky a lékařské informatiky 3. LF UK v Praze

Školitel: Prof. MUDr. Tatjana Dostálová, DrSc., MBA

Úvod: Hemangiom je mezenchymový nádor vycházející z krevních cév patřící společně s cévními malformacemi do skupiny vaskulárních anomálií. Tyto anomálie se nejčastěji vyskytují v dětském věku. Postihují v 80% případů převážně hlavu a krk, kde se vyskytují hlavně na bradě, čele a v preaurikulární oblasti. Postihují až 10% dětí a bývají častější u dívek. Jejich patogeneze zůstává stále nejasná.

Cíl: Cílem naší studie bylo porovnat účinnost léčby - kurativní účinek a nežádoucí účinky, jako je ztráta pigmentace a přítomnost jizvy - mezi klasickými chirurgickými technikami a terapií laserem.

Materiál a metody: Retrospektivně byla zhodnocena skupina 223 pacientů s cévní anomálií. Jedna kontrolní skupina léčena PDL laserem, s aktivním médiem Rhodamin G (595 nm, 1,5 ms, 7 mm, 9 - 11 J/cm²). V další kontrolní skupině byla použita klasická chirurgická terapie v celkové anestezii. Jako marker úspěšné léčby byla hodnocena doba léčení, výskyt jizev, ztráta pigmentace v dané oblasti a recidivy.

Výsledky: Výsledky léčby byla hodnoceny statisticky pomocí Fischerova testu s Haldanovou korekcí. Pro chirurgickou terapii je optimální hemangiom s velikostí větší než 1 cm. Nevýhodou této terapie je přítomnost jizvy a možná recidiva (v 5 případech). Operace není nikdy provázena ztrátou pigmentace. Aplikace PDL laseru je vhodnější u anomálií menších než 1 cm. Výhodou je nepřítomnost jizvy a neinvazivnost terapie. Rozdíly mezi oběma pracovními postupy byly statisticky signifikantní.

Závěr: Studie potvrdila, že PDL laser má optimální léčebný efekt u malých lézí (přibližně do 1 cm). Chirurgická léčba v celkové anestezii je vhodnější u rozsáhlejších hemangiomů, nevýhodou této terapie je přítomnost jizvy.

Podpora projektu: Studie vznikla za podpory projektu IGA MZ ČR (13351-4) a 00064203 (FN MOTOL)

P-05. DISTRIBUCE PERIARTERIÁLNÍCH ŽÍRNÝCH BUNĚK PRODUKUJÍCÍCH MMP-13 V PLICÍCH POTKANŮ V HYPOXII OVLIVNĚNÉ PODÁVÁNÍM KROMOGLYKÁTU SODNÉHO

Novotný T.¹, Wasserbauer R.¹, Malíková J.^{1,2}, Uhlík J.¹, Vajner L.¹

¹Ústav histologie a embryologie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze; ²Pediatrická klinika, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Školitel: Doc. MVDr. Luděk Vajner, CSc.

Úvod: Prostředí se sníženým obsahem kyslíku vede k rozvoji hypoxické plicní hypertenze (HPH), která vzniká jako důsledek hypoxické remodelace (HR) odporových plicních artérií (RPA) (u potkana $\varnothing < 100 \mu\text{m}$).

Procesy remodelace jsou vyvolány mj. uvolňováním produktů žírných buněk (ŽB), zejména pak intersticiální kolagenázy (u potkana matrix-metaloproteinázy 13, MMP-13). Remodelační procesy lze proto výrazně modifikovat a zpomalit stabilizací granul ŽB kromoglykátem sodným (KS).

Cíl: Abychom lokalizovali působení intersticiální kolagenázy na cévní stěny, hodnotili jsme změny v distribuci MMP-13 pozitivních ŽB (MMP13ŽB) v okolí RPA v průběhu akutní a chronické hypoxie.

Materiál a metody: 64 samců potkana Wistar-Han bylo rozděleno do 8 skupin po 8 jedincích a vystaveno 4 denní (H4) nebo 21 denní (H21) normobarické hypoxii (10 % kyslíku) za současné různě časované intraperitoneální aplikace KS. K imunohistochemické detekci MMP13ŽB na parafinových řezech byla použita králičí polyklonální protilátka Anti-MMP13 (Abcam - ab75606), reakce byla vizualizována králičím HRP/DAB kitem (Abcam - ab94726). Distribuci MMP13ŽB jsme hodnotili analyzátozem obrazu NIS Elements 3.0 AR. Data byla statisticky vyhodnocena softwarem Statistica 10.0 (Kruskal-Wallis ANOVA test, $p < 0,05$).

Výsledky: H4 vede k poklesu počtu MMP13ŽB v tunica adventitia (TA) RPA oproti skupině ošetřené KS, kde nedošlo k rozvoji HR, i oproti skupině kontrolní (normoxické, NC). H21 vede k poklesu počtu MMP13ŽB v TA RPA ve srovnání s NC. Morfologicky je tento stav charakterizován progresí HR RPA. Podávání KS na konci H21 nemá na tento stav žádný efekt. Podávání KS v prvních 4 dnech H21 vede k omezení poklesu počtu MMP13ŽB v TA RPA. Terapie KS nemá dlouhodobý efekt, HR již začala, je však opožděná a morfologicky modifikovaná.

Závěr: Změny v distribuci MMP13ŽB odpovídají jejich předpokládané degranulaci v průběhu H4 a H21.

Podávání KS vede k omezení degranulace ŽB, a tím i ke změnám v distribuci MMP13ŽB. Výsledky pokusu přinesly jednoznačnou morfologickou podporu funkčních experimentů, kdy aplikace KS v časných fázích H4 a H21 výrazně omezila rozvoj obrazu HPH (Baňasová a spol., 2008).

Podpora projektu: Projekt byl podpořen grantem GAUK č. 74108.

P-06. ÚLOHA BMH PROTEINŮ V REGULACI ENZYMOVÉ AKTIVITY KVASNIČNÉ NEUTRÁLNÍ TREHALASY

Veisova, D.^{1,2}, Macakova, E.^{1,2}, Rezabkova, L.^{1,3}, Sulc, M.^{4,5}, Vacha, P.^{1,3}, Sychrova, H.¹, Obsil, T.^{1,3}, Obsilova, V.¹

¹Fyziologický ústav AV ČR, Praha; ²lékařská fakulta UK, Praha; ³Přírodovědecká fakulta UK, katedra Fyzikální a makromolekulární chemie, Praha; ⁴Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha; ⁵Přírodovědecká fakulta UK, katedra Biochemie, Praha

Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Úvod: Neutrální trehalasa 1 (Nth1, E.C. 3.2.1.28) je enzym patřící do skupiny hydrolas, který zajišťuje degradaci neredukujícího disacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy. Trehalosa je v buňce nahromaděna jako přirozená odpověď na stresové situace. V roce 2008 bylo zjištěno, že kvasničné isoformy Bmh1 a Bmh2 tvoří komplexy s Nth1. Šlo o první případ regulace enzymové aktivity pomocí kvasničných isoform 14-3-3 proteinů. Obě kvasničné isoformy jsou zodpovědné za kompletní enzymovou aktivitu Nth1 po fosforylaci PKA in vitro. Interakci Bmh proteinů s Nth1 zprostředkuje vazba závislá na fosforylaci.

Cíl: Cílem projektu je porozumění strukturní podstaty regulace aktivity enzymu Nth1 prostřednictvím vazby Bmh1 a Bmh2 proteinů. Metabolismus trehalosy je základní složkou odpovědi na stres v buňkách kvasinek. Objasnění mechanismů regulace aktivity Nth1, poskytuje velmi důležitou informaci týkající se mechanismu jak funkce 14-3-3 proteinu, tak i regulace aktivity Nth1 v kvasinkách.

Materiál a metody: Hlavními metodami, které byly použity pro studium této úlohy, byly cílená mutageneze, studium enzymové kinetiky, limitovaná proteolýza a analytická ultracentrifugace.

Výsledky: Metoda sedimentační analýzy a kinetická měření potvrzují, že obě kvasničné 14-3-3 isoformy tvoří stabilní komplexy s fosforylovanou Nth1 a touto vazbou významně zvyšují její enzymovou aktivitu, navíc Bmh proteiny významně zvyšují enzymovou aktivitu v porovnání s Ca²⁺. Provedení limitované proteolýzy potvrdilo, že Bmh proteiny interagují s N-koncem Nth1, ve kterém jsou obsaženy vazebné motivy a že v komplexu pNth1/Bmh chrání Bmh N-konec Nth1 před proteolytickou degradací. Kinetické studie v pokusech in vitro naznačují, že fosforylační místa vhodná pro vazbu s kvasničnými 14-3-3 proteiny se nacházejí na pozicích Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83 a že PKA fosforyluje Nth1 právě na těchto čtyřech pozicích. Pro vazbu Bmh s Nth1 jsou důležitá zejména fosforylační místa na pozicích Ser60 a Ser83. S těmito výsledky korespondují i experimenty provedené in vivo.

Závěr: Významem projektu je studium vlastností 14-3-3 proteinů, které se vyskytují ve všech eukaryotických organismech a regulují řadu klíčových biologických dějů v buňce, jako jsou regulace buněčného cyklu, přenosu signálu, apoptózy, jsou úzce spjaty s procesem rakoviny a objevují se i v souvislosti s některými neurodegenerativními onemocněními. Tímto projektem se podílíme na vysvětlení mechanismu aktivace enzymu Nth1 prostřednictvím Bmh proteinů.

Podpora projektu: Grantová agentura UK (Grant 350111)

P-07. PROGRESE CHOROBY U DĚTÍ S AUTOZOMÁLNĚ DOMINANTNÍM POLYCYSTICKÝM ONEMOCNĚNÍM LEDVIN

Jaroš A.¹, Janský P.¹, Seeman T.²

¹2.LF UK; ²Pediatrická klinika 2.LF UK a FN Motol

Pregraduální student

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Seeman, CSc.

Úvod: Autozomálně dominantní polycystické onemocnění ledvin (ADPKD) představuje s prevalencí 1:1000 nejčastější dědičné onemocnění ledvin. Rychlost progresu a klinický průběh choroby je značně variabilní, přičemž ledvinné cysty, zvětšení objemu ledvin a zvýšení krevního tlaku se mohou objevovat již v dětském věku.

Cíl: Popsat dlouhodobý vývoj ADPKD u dětských pacientů na základě dat z českého registru dětí s polycystózami ledvin.

Materiál a metody: Data od 77 pacientů s ADPKD z registru dětských pacientů s polycystózami ledvin byla digitalizována a retrospektivně analyzována. Sledovali jsme krevní tlak, denní exkreci proteinů a ultrazvukové (UZ) parametry struktury a funkce ledvin (délka, glomerulární filtrace vypočtená dle Schwartz). Tyto jsme pak porovnali s normou a zhodnotili jejich progresi v čase.

Výsledky: Průměrný věk prvního vyšetření byl 9,0 let (SD=5,7), posledního 14,8 let (SD=4,7). Průměrná doba sledování byla 7,3 let (SD=4,1). Celkem jsme zpracovali 347 vyšetření. Průměrná délka obou ledvin byla již při prvním vyšetření signifikantně větší než norma (n=70; levá: SDS=1,41; pravá: SDS=1,12; p<0,001 u obou). V průběhu sledování došlo k dalšímu zvýšení odchylky od normy (n=70; levá: rozdíl +1,2 SD; pravá: rozdíl +1,8 SD; p<0,001 u obou). Glomerulární filtrace se v průměru nelišila od normy (2,02 ml/m²/s ; n=295; norma 1,5-2,3 ml/m²/s) a v průběhu sledování se významně nezměnila (n=52; p=0,13). Krevní tlak byl u sledovaných pacientů vyšší než norma (průměrné SDS 0,97; p<0,001, n=284). Při prvním vyšetření byla zjištěna hypertenze (TK ≥95. percentil) u 11 pacientů (17%; n=64) a 3 pacienti (4,7%) užívali antihypertenziva. Při posledním vyšetření antihypertenziva užívalo již 23 pacientů (36%) a 3 (4,7%) byli hypertenzní. Celkový výskyt hypertenze a/nebo užívání antihypertenziv se v průběhu choroby významně zvýšil (22% vs. 41%, p<0,05). Při prvním vyšetření u 38 pacientů (75%; n=51) hodnoty proteinurie přesahovaly normu 100mg/m²/24h. Při posledním vyšetření přesahovalo normu jen 26 pacientů (51%; p<0,05). Pokles byl signifikantní i pro podskupinu pacientů nikdy neléčených antihypertenzivy (73% vs. 43%, n=30; p<0,05).

Závěr: Vývoj ultrazvukového nálezu, funkce ledvin i krevního tlaku odpovídá progresi ADPKD již u pacientů v dětském věku. Proteinurie je u ADPKD častým nálezem, její pokles v průběhu choroby představuje nové pozorování vyžadující další analýzu.

Podpora projektu: Institucionální financování FNM 6001/06.

P-08. VALPROOVÁ KYSELINA INDUKUJE DIFERENCIACI SPECIFICKY U AML1/ETO POZITIVNÍ AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE

Zápotocký M, Starková J., Mejstříková E., Trka J.

Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol

Školitel: prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

Úvod: Akutní myeloidní leukémie (AML) je heterogenní skupina maligních onemocnění charakterizovaná blokem diferenciací myeloidních progenitorů, proliferační výhodou a ztrátou schopnosti apoptózy. Léčba AML se v průběhu posledních dekád vylepšila, přesto i nyní lze vyléčit pouze část pacientů kombinací toxických cytostatik. V leukemogenezi u t(8;21) se předpokládá, že represorový komplex asociovaný s AML1/ETO chimérickým proteinem, který váže deacetylázy histonů (HDAC) a způsobuje interferenci s expresí AML1 cílových genů a blok v myeloidní diferenciaci. Bylo objeveno, že valproová kyselina (VPA) působí jako inhibitor HDAC.

Cíl: Hlavním cílem práce bylo charakterizovat diferenciační efekt VPA na AML1/ETO pozitivní leukemické buňky a určit změny v expresi RUNX1 cílových genů.

Materiál a metody: Kasumi-1 (M2 AML1/ETO pozitivní), Kasumi-6 (M2 AML1/ETO negativní), MV4-11 (MLL/AF4 pozitivní) a K562 buňky byly léčeny VPA a 12-O-tetra-decanoylforbol-13-acetátem (TPA) a vyšetřeny průtokovou cytometrií a qRT-PCR. AML1/ETO pozitivní a negativní primární patientské blasty ze dne diagnózy byly ovlivněny VPA a TPA k potvrzení in vitro zjištění.

Výsledky: VPA indukovala apoptózu u AML1/ETO pozitivních a MLL/AF4 pozitivních buněk. Změny v imunofenotypu prokazující diferenciaci byly pozorovány pouze u RUNX1-MTG8 pozitivních buněk (pokles exprese CD33/34/117 a nárůst CD11a/11b). Ukázalo se, že diferencované buňky jsou také AnnexinV pozitivní, tudíž jsme dále zkoumali vztah mezi diferenciací a buněčnou smrtí. Apoptóza byla zablokována kaspázovým inhibitorem a i přesto zůstala diferenciací nezměněna. TPA bylo použito k vyloučení neschopnosti AML1/ETO negativní linie diferencovat a zjistili jsme, že tato linie podstoupí monocytární diferenciaci po léčbě TPA. Pomocí kvantifikace mRNA jsme prokázali, že léčba VPA zvýšila expresi genů PU.1, IGFBP7, BPI a C/EBP α pouze u AML1/ETO pozitivní linie a nikoliv u ostatních testovaných linií. U všech patientských vzorků z kostní dřeně byla indukována apoptóza bez ohledu na genotyp, ale změny v imunofenotypu ve smyslu diferenciací se ukázaly být specifické pouze pro blasty s AML1/ETO fúzním genem.

Závěr: Poskytli jsme validní důkaz diferenciací specifické pro AML1/ETO pozitivní buňky doprovázené vzestupem exprese původně umlčených genů. Naše zjištění týkající se diferenciací následované apoptózou vneslo nový pohled na mechanismus účinku starého léku. Naše data podporují hypotézu, že AML1/ETO pozitivní pacienti by mohli mít z léčby VPA největší benefit.

P-09. MODEL PLICNÍ HYPERTENZE INDUKOVANÉ REVERZIBILNÍM TLAKOVÝM PŘETÍŽENÍM LEVÉ SRDEČNÍ KOMORY U POTKANA.

Chovanec M.^{1,2}, Hergert J.¹

¹Ústav fyziologie, 2.LFUK v Praze; ²Kardiologické oddělení, Nemocnice na Homolce, Praha

Školitel: prof. MUDr. Jan Hergert DrSc.

Úvod: Plicní hypertenze představuje zdravotní komplikaci, jejíž mortalita a morbidita je vysoká.

Cíl: Vyšetřovali jsme model plicní hypertenze vyvolané levostranným srdečním selháním indukovaným intravaskulární obstrukcí ascendentní aorty polyethylenovou kanylou cestou pravé karotidy u laboratorního potkana.

Materiál a metody: Kanyla obturující ascendentní aortu byla zavedena po dobu 1 týdne (skupina 1wk, n=7), po dobu 3 týdnů (skupina 3wks, n=6) a po dobu 3 týdnů s následným 3 týdenním zotavovacím obdobím (skupina 3+3wks, n=8).

V experimentu A, jsme měřili hmotnost srdce (poměr RV/BW a RV/LV+S).

V experimentu B, jsme měřili střední krevní tlak v plicnici u živých zvířat (PAP). Tato část experimentu byla doplněna o normoxické kontroly (skupina N, n=8) a zvířata vystavena normobarické hypoxii (FiO₂ - 10%) po dobu 3 týdnů (skupina H, n=8).

Výsledky: V experimentu A, jsme v skupinách 1wk a 3+3wks v porovnání s kontrolami nezjistili rozdíly v srdečních hmotnostech. V skupině 3wks byl poměr RV/BW ($54,8.10^{-5} \pm 3,2.10^{-5}$ vs. $47,4.10^{-5} \pm 1,6.10^{-6}$; $p < 0,05$) a poměr RV/LV+S ($0,39 \pm 0,024$ vs. $0,27 \pm 0,008$; $p < 0,01$) výrazně větší oproti kontrolám.

V experimentu B, byla hodnota PAP v skupinách 1wk a 3wks výrazně větší v porovnání s normoxickými kontrolami ($25,0 \pm 1,18$ mmHg a $22,9 \pm 0,66$ mmHg vs. $16,9 \pm 0,97$ mmHg; $p < 0,01$ a $p < 0,05$ dle pořadí), ale zároveň výrazně menší oproti skupině H ($25,0 \pm 1,18$ mmHg a $22,9 \pm 0,66$ mmHg vs. $33,4 \pm 2,0$ mmHg; $p < 0,001$ a $p < 0,0001$ dle pořadí). Hodnota PAP v skupině 3+3wks se oproti normoxickým kontrolám nelišila.

Závěr: Představujeme jednoduchou, dobře tolerovanou a plně reverzibilní metodu vyvolání srdečního selhání levé srdeční komory tlakovým přetížením vedoucím k rozvoji významné plicní hypertenze.

Podpora projektu: Podpořeno grantem GACR 305/05/08/108.

P-10. GONIOVÝ ÚHEL V IDENTIFIKACI LIDSKÝCH POZŮSTATKŮ

Gabčová D.¹, Dostálová, T.¹, Eliášová H.², Feberová J.³, Morávková R.¹, Kamínek M.⁴, Hofmanová P.¹

¹Stomatologická klinika dětí a dospělých FN Motol; ²Kriminalistický ústav, Praha; ³Ústav vědeckých informací, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze; ⁴Ortodontické oddělení Stomatologické kliniky, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Školitel: prof. MUDr. Taťjana Dostálová, DrSc., MBA

Úvod: Identifikace lidských pozůstatků je důležitou součástí medicínsko-právní praxe. Evoluce a postupné funkční změny vedly ke změně velikosti goniového úhlu. Goniový úhel svírá tečna k zadními okraji mandibuly a mandibulární linie. Na telerepentgeny je vyznačen spojnicí bodů articulare, gonion a menton.

Cíl: Cílem této studie bylo vyhodnotit a srovnat goniový úhel ve dvou vzorcích kaukazské populace z hlediska dlouhodobého vývoje lebky.

Materiál a metody: Celkově bylo vyhodnoceno 190 telerepentgenů (75 forenzních subjektů a 115 archeologických subjektů z 8. - 12. století). Telerepentgeny byly vyhodnoceny digitálně pomocí programu Dolphin Imaging 11.0. Goniový úhel byl měřen pomocí tečny k nejspodnějšímu okraji mandibuly a a další tečny k jejímu zadnímu okraji. Tyto linie společně tvoří ramena goniového úhlu s vrcholem v jejich průsečíku.

Výsledky: Průměrná hodnota goniového úhlu u historických lebek byla 124,48 stupňů, ve srovnání s forenzími lebkami, u kterých byla průměrná hodnota 119,40. Nepárový dvouvětvý t-test za předpokladu rovnováhy proměnných vykázal signifikantní výsledky. Rozdíl byl - 5,09 se standardní odchylkou 1,05 (95 % s intervalem spolehlivosti 7,15 - 3,02). Na základě hodnoty $P < 0.0001$ lze potvrdit hypotézu, že rozdíl úhlů u forenzních a archeologických lebek je statisticky signifikantní.

Závěr: Výrazné transformační změny goniového úhlu lze přisoudit několika faktorům; je známo, že se čelisti nevyvíjí pouze dle jednoho charakteristického modelu. Tato studie dospěla k závěru, že v průběhu vývoje došlo k signifikantním rozdílům v goniovém úhlu. Může tak sloužit jako doplňkový forenzní parameter.

P-11. NEGATIVNÍ VLIV PERZISTUJÍCÍ TEPENNÉ DUČEJE NA KOŽNÍ MIKROCIRKULACI NEDONOŠENÝCH NOVOROZENCŮ

Zuzana Mormanová^{1,2,3}, Alexandra Schwepcke¹, Stephan Hiedl¹, Florian Weber¹, Orsolya Genzel-Boroviczeny¹

¹Neonatologie, Pediatrická klinika Dr. v. Haunersches Kinderspital, Univerzita Ludvíka Maximiliána, Mnichov; ²Ústav patologické fyziologie, 2.lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha; ³Novorozenecké odd. s JIRP, FN Motol, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Martin Vízek, CSc.

Úvod: Perzistující tepenná dučej (PDA) je jednou z nejčastějších komplikací nedonošených novorozenců, která výrazně ovlivňuje hemodynamickou situaci dítěte.

Cíl: Promítají se tyto změny i na úrovni mikrocirkulace?

Materiál a metody: U celkem 25ti nedonošených novorozenců (stáří < 32 gestačních týdnů, porodní hmotnost < 1250g), z nichž u 13ti echokardiograficky prokázána hemodynamicky významná PDA a u 12ti prokázána buď hemodynamicky nevýznamná či žádná PDA, byly prospektivně měřeny mikrocirkulační parametry (funkční hustota a průměr kapilár) metodou analýzy vedlejších paprsků v tmavém poli – Side Stream Dark Field Imaging (SDF). Neinvazivní měření probíhala na kůži obou paží od 3. dne života do průkazu uzavření PDA ve skupině s hemodynamicky významnou PDA a do 7. – 8. dne ve skupině bez PDA.

Výsledky: Před zahájením léčby je funkční hustota kapilár ve skupině s hemodynamicky významnou PDA signifikantně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou bez PDA. Ve skupině s hemodynamicky významnou PDA se ve struktuře kožní mikrocirkulace vyskytuje nápadně méně velkých cév (průměr > 20 μm) a signifikantně více malých cév (průměr < 10 μm). Po úspěšné léčbě hemodynamicky významné PDA tyto změny mizí. Regresní analýza prokázala inverzní vztah korelace mezi echokardiografickými hemodynamickými parametry a funkční hustotou kapilár ($P < 0.005$).

Závěr: Hemodynamicky významná PDA silně ovlivňuje stav mikrocirkulace nedonošených novorozenců, kdy dochází k redukci funkční hustoty kapilár a změnám v rozložení velikosti těchto cév. Redistribuce průtoku s upřednostněním malých cév se zdá být kompenzačním mechanismem zajišťujícím fungující metabolismum tkání.

P-12. LOKALIZAČNÍ VÝZNAM IKTÁLNÍHO SPECT U DĚTÍ S EPILEPSIÍ NA PODKLADĚ TUBERÓZNÍ SKLERÓZY

Jahodová A.¹, Kršek P.¹, Kudr M.¹, Duchowny M.²

¹Klinika dětské neurologie, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Fakultní nemocnice Motol, Praha, Česká republika; ²Department of Neurology and Comprehensive Epilepsy Program, Brain Institute, Miami Children's Hospital, Miami, United States

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Kršek, Ph.D.

Úvod: Tuberosní skleróza (TSC) je multisystémové onemocnění charakterizované tvorbou benigních tumorů nejčastěji v kůži, mozku, ledvinách a srdci. Nejčastějším neurologickým příznakem je epilepsie, která se vyskytuje až u 90% pacientů a je často farmakorezistentní. Nekompenzovaná epilepsie je hlavní příčinou opoždění vývoje a kognitivních deficitů u dětí s TSC. Chirurgická léčba je proto u pacientů s TSC jednou z možností. Epileptochirurgická rozvaha u TSC je však velmi komplikovaná výskytem multifokálních strukturálních lézí mozku (tuberů), častou manifestací více typů záchvatů i více ložisek epileptiformní EEG aktivity. Iktální SPECT je radioizotopová neurovizuální metoda využívající vyšetření změn mozkové perfúze v průběhu záchvatu k lokalizaci epileptogenní zóny.

Cíl: Zhodnotit praktický přínos a schopnost lokalizovat zónu začátku záchvatů pomocí iktálního SPECT vyšetření u dětských pacientů s TSC a farmakorezistentní epilepsií.

Materiál a metody: Zhodnotili jsme 52 iktálních SPECT studií u 26 pacientů operovaných pro farmakorezistentní epilepsii na podkladě TSC v Miami Children's Hospital, v letech 1994-2010. Byl stanoven rozsah a lokalizace mozkové hyperperfúze a porovnáním s resekční dutinou na pooperačním MRI i kompletnost jejího operačního odstranění. Pacienti byli rozděleni na skupiny s neresekovanou, částečně resekovanou a kompletně resekovanou zónou hyperperfúze. Tyto nálezy byly porovnány s výsledkem epileptochirurgie (outcome).

Výsledky: Z celkového počtu 52 iktálních SPECT studií, 35 bylo u pacientů bez předchozí epileptochirurgie, 9 studií bylo provedeno po předchozím neúspěšném resekčním výkonu následovaném reoperací, 8 vyšetření bylo provedeno u operovaných pacientů, kteří již nebyli indikováni k reoperaci. 11(21%) vyšetření bylo nelokalizujících. Kortikální hyperperfúze byla přítomna u 41(79%) SPECT studií, její rozsah byl následující: 10(24%) fokální, 13(32%) lobární, 11(27%) multilobární, 2(5%) hemisferální a 5(12%) bilaterální. Příznivý pooperační výsledek (≥90% redukce záchvatů) byl dosažen u 6/6 (100%) pacientů s kompletně resekovanou zónou hyperperfúze, u 8/23(35%) s částečně resekovanou, 5/7(71.5%) s neresekovanou a v 1/8(12.5%) případech s nelokalizujícím SPECT vyšetřením.

Závěr: Kompletní resekce oblasti hyperperfúze při iktálním SPECT vyšetření je prediktor úspěšné chirurgické léčby epilepsie u dětských pacientů s TSC. Epileptochirurgická rozvaha u těchto nemocných je nicméně komplexní; výsledky iktálního SPECT by vždy měli být korelovány s ostatními daty.

Podpora projektu: IGA NT/11443-5

P-13. ROZŠÍŘENÍ BAZÁLNÍ MEMBRÁNY A ZVÝŠENÁ DEPOZICE LAMININU U DĚTÍ S CHRONICKÝMI OBSTRUKČNÍMI RESPIRAČNÍMI ONEMOCNĚNÍMI.

Hoňková L.¹, Beránková K.¹, Uhlík J.², Pohunek P.¹

¹Pediatrická klinika, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a FN Motol Praha; ²Ústav histologie a embryologie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Petr Pohunek, DrSc.

Úvod: Remodelační změny bronchiální sliznice jsou popisovány u nemocných s bronchiálním astmatem (AB) a byly považovány za patognomické pro tuto diagnózu. Potvrzeny byly v řadě studií i u dětí s časnými formami nemoci. Specifická těchto změn pro diagnózu AB je nicméně v současné době zpochybňována. Ukazuje se, že tyto změny lze zřejmě nalézt i u jiných zánětlivých onemocnění průdušek provázených bronchiální obstrukcí, např. cystické fibrózy (CF).

Cíl: Cílem naší studie je vzájemně porovnat histologické změny bronchiální sliznice u dětí s AB, CF, primární ciliární dyskinezi (PCD) a u zdravých kontrol a ověřit, zda jsou tyto změny specifické pro diagnózu AB nebo mohou být pozorovány i u jiných chronických obstrukčních respiračních onemocnění (CORD).

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno 31 dětí ve věku 4 až 19 let (10.25 ± 3.78 r) podstupujících bronchoskopické vyšetření z diagnostické či léčebné indikace. Šest dětí bylo zařazeno mezi zdravé kontroly (8.71 ± 2.91 r), 16 dětí mělo diagnózu AB (9.85 ± 3.34 r), 5 CF (11.1 ± 3.50 r) a 5 PCD (12.43 ± 4.88 r). Všem pacientům byl odebrán vzorek sliznice pomocí endobronchiální biopsie a tkáň byla zpracována pro potřeby světelné mikroskopie. Vzorky jsme přehledně obarvili hematoxylinem a eosinem a provedli jsme imunohistochemický průkaz lamininu. Preparáty jsme hodnotili pomocí počítačového analyzátoru obrazu. U všech vzorků jsme měřili šířku bazální membrány (BM) a její laminin-pozitivní vrstvy (LAM).

Výsledky: Zjistili jsme signifikantní rozdíl v šířce BM (7.21 ± 1.09 μm vs. 4.33 ± 0.43 μm , $p < 0.01$) a signifikantní nárůst v šíři LAM (2.69 ± 0.41 μm vs. 1.78 ± 0.17 μm , $p < 0.01$) u dětí s CORD v porovnání se zdravými kontrolami. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly vzájemně mezi skupinami AB, CF a PCD.

Závěr: Signifikantní rozšíření bazální membrány a její laminin-pozitivní vrstvy lze pozorovat u dětí s různými CORD. Proti dřívějším zjištěním, vycházejícím především ze srovnání nemocných s AB a kontrol, naše výsledky podporují hypotézu, že tento nálezn není specifický pro diagnózu AB a remodelační změny lze pozorovat i u dětí s CF a PCD.

Podpora projektu: Práce byla podpořena výzkumnými projekty GAUK 340911 a IGA MZ NT/11444.

P-14. DIAGNOSTICKÝ A PROGNOTICKÝ VÝZNAM DETEKCE EXPRESE PROTEINU INI1 A VYŠETŘENÍ GENU INI1/HSNF5/SMARCB1 U EMBRYONÁLNÍCH NÁDORŮ CNS

Pavličková K.¹, Vícha A.², Vasovčák P.³, Churáčková M.², Sumerauer D.², Gajdoš P.⁴, Kalinová M.¹, Kodet R.¹, Zámečník J.¹

¹Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol; ²Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol; ³Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol; ⁴Centrum laboratorních činností, Státní zdravotní ústav

Školitel: Doc. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D.

Úvod: Atypické teratoidní/rhabdoidní nádory (AT/RT) jsou morfologicky často obtížně odlišitelné od ostatních embryonálních nádorů CNS - zejména meduloblastomů a primitivních neuroektodermálních nádorů CNS (PNET CNS). Toto odlišení je však vzhledem k agresivnějšímu chování a jinému terapeutickému postupu u AT/RT nezbytné. V diferenciální diagnostice je diskutován význam imunohistochemické (IHC) detekce exprese proteinu INI1. Ten je podjednotkou hSWI/SNF ATP dependentního chromatin remodelujícího komplexu a je kódovaný SMARCB1 genem lokalizovaným na 22q11.2. Změny v tomto genu a následná ztráta exprese proteinu INI1 je dle WHO klasifikace nádorů CNS pro AT/RT diagnostická. Přesto bylo publikováno několik AT/RT se zachovanou expresí tohoto proteinu.

Cíl: Cílem naší práce bylo zhodnotit diagnostický a prognostický význam exprese proteinu INI1 v naší sestavě embryonálních nádorů CNS a korelovat tuto expresi s analýzou genu SMARCB1.

Materiál a metody: Soubor tvořilo 30 pacientů (9 AT/RT, 17 meduloblastomů a 4 PNET CNS). K IHC průkazu exprese proteinu INI1 byla použita protilátka anti-BAF47 (BD Transduction Lab.). DNA analýza (MLPA, SNP array, sekvenace DNA) byla provedena u všech pacientů s absencí INI1 proteinu. Křivky přežití byly sestrojeny pomocí Kaplan-Meierovy metody. Srovnání přežívání jednotlivých skupin pacientů bylo provedeno log rank testem.

Výsledky: Ztráta exprese proteinu INI1 byla detekována u 7/9 AT/RT, u 1/17 meduloblastomů a u 1/4 PNET CNS. Celkové přežití (OS) i přežití bez progresu nemoci (EFS) bylo sníženo u pacientů s AT/RT ve srovnání s ostatními typy nádorů (OS: $p = 0,001$; EFS: $p = 0,002$). OS pacientů se ztrátou exprese proteinu INI1 bylo nižší než u pacientů se zachovanou expresí INI1 ($p = 0,027$). Ve všech případech ztráty exprese INI1 proteinu byla v nádorové tkáni zjištěna abnormalita DNA v oblasti 22q11, zahrnující zejména homozygotní a heterozygotní delecí celého genu SMARCB1 a homozygotní delecí exonu 6 a 7 genu SMARCB1. U pacienta s meduloblastomem neexprimujícím protein INI1 byla nalezena germinální delece exonu 7 genu SMARCB1.

Závěr: Ztráta exprese proteinu INI1 se v našem souboru neukázala být zcela určující pro diagnózu AT/RT – některé nádory vzhledu AT/RT protein INI1 exprimovaly, ztráta exprese proteinu INI1 byla naopak zaznamenána u nádorů morfologie a biologického chování ne zcela typického pro diagnózu AT/RT. Ztráta exprese INI1 proteinu je nezávisle na morfologii nádoru negativním prognostickým znakem.

P-15. MORFOLOGICKÉ ZMĚNY VE STĚNĚ DÝCHACÍCH CEST U POTKANŮ PO ALERGENNÍ STIMULACI

Šimůnková P.¹, Beránková K.¹, Vajner L.², Uhlík J.², Pohunek P.¹

¹Pediatriká klinika 2. LF UK a FN Motol Praha; ²Ústav histologie a embryologie 2. LF UK Praha

Školitel: prof. MUDr. Petr Pohunek, CSc.

Úvod: Přibližně 40 % světové populace má zvýšené riziko rozvoje alergických onemocnění, která mohou vést až k projevům průduškového astmatu. Díky morfoloogickým a imunologickým studiím dokazujícím přítomnost aktivního zánětu došlo ke změně pohledu na alergie a jejich léčbu. Společně se zánětem jsou ve stěně dýchacích cest pacientů s astmatem přítomny i různé morfoloogické změny souhrnně označované pojmem remodelace. Tyto změny ve stěně průdušek u astmatiků jsou dobře popsány především u dospělé populace. Méně publikací se zabývá popisem remodelačních změn u dětí a ještě méně prací se věnuje této tématice na zvířecích modelech. Jedním z důvodů je, že přirozené průduškové astma se u zvířat prakticky nevyskytuje.

Cíl: Rozhodli jsme se tedy analyzovat strukturální změny intrapulmonálních dýchacích cest u potkanů kmene Brown Norway (BN). Tento kmen je znám svou schopností významně reagovat na různé alergenní podněty a, pokud je vystaven náležitě stimulaci, rozvinout stav, který se klinicky podobá průduškovému astmatu u lidí. Naším cílem bylo ověřit vznik a stupeň rozvoje remodelace u tohoto laboratorního modelu.

Materiál a metody: U dospělých BN potkanů byla provedena senzitivace opakovanou intraperitoneální aplikací ovalbuminu (OA). Další 2 týdny potkani pravidelně inhalovali ovalbumin v aerosolu. Současně probíhal pokus na 2 kontrolních skupinách. První skupině byl podáván intraperitoneálně i inhalačně fyziologický roztok (F), druhá skupina byla ponechána bez zásahů (K). Na konci experimentu byli potkani usmrceni a plíce byly zpracovány pro světelnou mikroskopii. V této studii jsme se zaměřili na morfometrické parametry stěny intrapulmonálních dýchacích cest, přítomnost eosinofilních granulocytů ve stěně dýchacích cest a počet epitelových sekrečních buněk spolu s kvalitou glykokonjugátů v jejich sekreci.

Výsledky: Stěna dýchacích cest u OA skupiny prokazovala známky remodelace. Celková plocha stěny dýchacích cest a plocha sliznice a svaloviny byla signifikantně zvýšená při srovnání se skupinami F a K. Ztluštění adventicie bylo signifikantní pouze u velkých bronchů, kde byl zároveň zjištěn vyšší výskyt eosinofilních granulocytů. Počet sekrečních buněk byl zvýšen ve všech bronších skupiny OA, neutrální a kyselé glykokonjugáty byly zjištěny proporcionálně ve všech skupinách.

Závěr: Studie potvrdila bronchiální senzitivitu u BN potkanů a položila morfoloogický základ pro další experimenty. Remodelační změny intrapulmonálních dýchacích cest byly velmi signifikantní.

Podpora projektu: Studie byla podporována grantem IGA MH CR NT 11459.

P-16. ROLE GENU WT1 A JEHO IZOFOREM V NORMÁLNÍ HEMATOPOÉZE A LEUKEMOGENEZE

Kramarzova K.¹, Stuchly J.¹, Willasch A.², Gruhn B.³, Schwarz J.⁴, Cermak J.⁴, Machova-Polakova K.⁴, Fuchs O.⁴, Stary J.¹, Trka J.¹ a Boublikova L.¹

¹CLIP–Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Nemocnice Motol, Praha, Česká republika; ²Department of Pediatric Hematology, Oncology and Hemostaseology; Goethe University, Hospital for children and adolescents II/III, Frankfurt am Main, Germany; ³Department of Pediatrics, University Hospital of Jena, Jena, Germany; ⁴Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha, Česká republika

Školitel: Prof. MUDr. Jan Trka, PhD.

Úvod: Vysokou expresi genu WT1 (Wilm's tumour gene 1) nacházíme u většiny akutních leukémií a dalších hematologických malignit. Existuje více než 36 variant genu WT1, které mají odlišné, částečně se překrývající funkce a jejich poměr významným způsobem ovlivňuje výslednou roli genu WT1. Vzhledem k nedostatku publikovaných dat však konkrétní význam expresního profilu variant WT1 stále zůstává nejasný.

Cíl: Cílem studie bylo stanovení poměru 4 hlavních izoforem genu WT1 lišících se přítomností dvou sestřihových oblastí – exonu 5 a tzv. inzertu KTS (A[-/-], B[+/-], C[-/+], D[+/+]) ve vzorcích pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), myelodysplastickým syndromem (MDS) a zdravých kontrol.

Materiál a metody: Vyvinuli jsme unikátní qPCR metodu pro kvantifikaci 4 hlavních izoforem genu WT1. Pomocí této metody jsme provedli analýzu 8 leukemických linií, 152 diagnostických vzorků KD dospělých resp. dětských pacientů s AML a MDS a také 23 zdravých KD.

Výsledky: Medián celkové exprese WT1 byl $29 \text{ WT1/ABL} \times 10^4 \text{ NCN}$. Buňky dospělých i dětských AML exprimovaly WT1 na signifikantně vyšší hladině oproti zdravým kontrolám ($2058 \text{ resp. } 3446 \text{ WT1/ABL} \times 10^4 \text{ NCN}$; $p < 0.0001$). MDS pacienti měli expresi WT1 cca o řád nižší než AML (medián $196 \text{ WT1/ABL} \times 10^4 \text{ NCN}$).

Prokázali jsme excelentní korelaci celkové hladiny WT1 a součtu hladin jeho jednotlivých variant. Analýza poměru izoforem WT1 ukázala odlišné expresní profily ve vzorcích leukemických linií ($p < 0.0001$), přičemž linie nesoucí stejný fúzní gen MLL/AF4 měly identické i poměry izoforem WT1. Nízká hladina celkového WT1 umožnila analýzu izoforem WT1 pouze u limitovaného počtu zdravých kontrol, kde jsme našli poměr 1,2 : 1,8 : 1,7 : 5,3 pro varianty A, B, C a D. U pacientů s AML jsme detekovali překvapivě uniformní profil izoforem WT1 s poměrem 0,9 : 2,5 : 1,1 : 5,5 u dětských a 1,3 : 3,1 : 1,3 : 4,5 u dospělých AML pro WT1 A, B, C a D, bez ohledu na morfologické a/nebo genetické subtypy. Na rozdíl od AML jsme u MDS našli odlišný a variabilnější poměr izoforem (1,6 : 1,5 : 1,7 : 4,6 pro WT1 A, B, C a D). Rozdíly mezi jednotlivými diagnózami potvrdila také nesupervidovaná klastrová analýza na základě poměrů hladin jednotlivých izoforem.

Závěr: Pomocí námi vyvinuté unikátní metodiky jsme stanovili expresní vzorec variant WT1 u AML a MDS. AML pacienti všech podskupin vykazují překvapivě uniformní poměr izoforem WT1, zatímco u MDS je tento poměr značně variabilnější. Naše výsledky tak naznačují význam konkrétního poměru izoforem WT1 v maligní transformaci myeloidní linie.

Podpora projektu: UNCE204012

P-17. CYTOGENETICKÉ A MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ VYBRANÝCH NÁDORŮ DĚTSKÉHO VĚKU.

Stejskalová E.¹, Mališ J.¹, Kabíčková E.¹, Kodet R.²

¹Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol; ²Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2.LF a FN Motol

Školitel: Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, PhD

Úvod: U nádorové tkáně s málo diferencovanou či nediferencovanou morfologií může být i přes pokrok v imunohistochemii diferenciální histopatologická diagnostika obtížná. Nenáhodně, pro určitý typ nádoru charakteristické chromozomální přestavby, jsou viditelným znakem odlišné biologie, tedy genetickým markerem nádorových buněk. Zároveň jsou nezbytným výchozím bodem pro cílené a mnohem citlivější vyšetření na molekulární úrovni při identifikaci genů důležitých v procesu nádorového bujení. Cytogenetické vyšetření solidních nádorů je technicky obtížné a úspěšnost nemusí být vysoká. Má ale jednu nespornou výhodu : v jediném vyšetření je možné hodnotit celý nádorový genom.

Cíl: Náplní mé výzkumné práce je cytogenetické vyšetření pacientů, doplněné v případě potřeby a při dostatku materiálu o molekulárně cytogenetické vyšetření (FISH, MFISH, arrayCGH). Praktickým výstupem, s významem pro klinickou praxi, je korelace chromozomálních nálezů s klinickými parametry a histopatologickým cytologickým vyšetřením. Smyslem je ověření výpovědní hodnoty chromozomálních aberací pro správné stanovení diagnózy či prognózy.

Materiál a metody: Nádorová tkáň, použitá k cytogenetickému vyšetření, je získána při excizi primárního nádoru nebo při probatorní biopsii. Menší část vzorků pochází z biopsií či excizi při relapsu, tedy již po léčbě. Techniky in vitro kultivace se řídí typem nádoru, pracovní diagnózou, lokalizací odebrané tkáně. Zpracování suspenze nádorových buněk je provedeno dle standardně v literatuře popsaných technik. Preparáty jsou po několika dnech přirozeného stárnutí obarvené trypsin-Giemsou proužkovací technikou, vyhodnocené pod mikroskopem Olympus BX 40 a karyotypované i archivované s pomocí systému pro automatickou analýzu chromozomů Metasystem Ikaros .

Výsledky: V rámci našeho souboru 74 pacientů s chromozomálními nálezy přínosnými v diferenciálně diagnostické rozvaze u nádorů z malých tmavých buněk a sarkomů měkkých tkání a kostí, pro přehlednost sdělení, uvádíme ilustrativní kazuistiky. Součástí sdělení je porovnání vyšetření 47 pacientů s nádory ledvin klasickou cytogenetikou s vyšetřením arrayCGH technikou.

Závěr: Naše výsledky potvrzují závěry publikované v zahraniční literatuře o smysluplnosti vyšetření karyotypu nádorových buněk pacientů s nádorovým onemocněním. V současné praxi jsou cytogenetické změny podnětem pro následná cílená vyšetření imunohistochemickými či molekulárními technikami, při ne zcela jednoznačné diagnóze nebo za účelem prohloubení znalostí procesu nádorového bujení.

P-18. SENSORY VASOPRESSIN AND OXYTOCIN UNVEILED IN RATS

Forostyak O.^{1,2}, Forostyak S.², Arboleda D.², Dayanithi G.^{2,3}, Sykova E.^{1,2}

¹Department of Neuroscience, Charles University, Second Medical Faculty, Prague, Czech Republic;

²Institute of Experimental Medicine Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague, Czech Republic; ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité de recherche U710, Université Montpellier 2, F-34095 Montpellier cedex 5; and Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France

Supervisor: prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., FCMA

Introduction: The neurohormones, vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) exert many important cognitive and physiological functions. Both AVP and OT have been reported to have analgesic effect, however the mechanisms, underlying this effect remain unclear. Dorsal root ganglia (DRG) are integrative centres containing the cell bodies of sensory neurons receiving somatic sensation information from the periphery and transmitting them to the spinal cord.

Aims: In this study we used newly generated transgenic rats (AVP-eGFP, OT-eCFP and OT-mRFP1) tagged by a visible fluorescent proteins to study the role of OT and AVP in the dorsal root ganglia neurons.

Materials and Methods: Using Fura-2 fast fluorescence microspectrofluorimetry, we have characterized $[Ca^{2+}]_i$ responses in single DRG neurons isolated from transgenic and nontransgenic rats and cultured in vitro. Immunocytochemistry, fluorescence microscopy, and confocal imaging were employed to visualize fluorescent AVP and OT, as well as a number of cell markers.

Results: Our results showed that both AVP and OT are expressed and can be visualized in the dorsal root ganglia neurons (both in freshly isolated and cultures in vitro up to 5 days). The immunostaining against neuronal markers (NF160, β III tubulin, NeuN) were co-localized with the endogenous AVP-eGFP-, OT-eCFP- and OT-mRFP1 fluorescence, as well as with the immunostainings against AVP and OT. The $[Ca^{2+}]_i$ measurements from these neurons (between 2 and 120 hours) revealed that AVP/OT-responsive neurons responded also to the applications of capsaicin (TRPV1 receptor agonist), indicating a role of these neuropeptides in nociception. The immunostaining against TRPV1 receptor was co-localized with AVP and OT and with the endogenous AVP-eGFP-, OT-eCFP- and OT-mRFP1 fluorescence. The expression of OT in DRG neurons increased significantly during pregnancy and lactation. All the above findings were confirmed in a series of control experiments using nontransgenic Wistar rats.

Conclusions: We report for the first time that both AVP and OT are expressed and can be visualized in the nociceptive dorsal root ganglia neurons in rats, and that the expression of oxytocin significantly increases during pregnancy and lactation.

Support: PITN-GA-2008-214003; GACR P303/11/0192, GACR P304/12/G069.

P-19. GENETICKÉ MARKERY ATEROSKLERÓZY A ATEROTROMBÓZY

Oravec M.¹, Kotaška K.², Kotlín R.³, Linhartová K.¹, Dyr J.E.³, Veselka J.¹, Malý M.⁴

¹Kardiologická klinika UK 2. LF a FN Motol, Praha; ²Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN Motol, Praha; ³Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; ⁴Interní klinika 1. LF UK a ÚVN, kardiologické oddělení

Školitel: Doc. MUDr. Martin Malý, Ph.D.

Úvod: Vybrané genetické polymorfizmy jsou spojovány se zvýšeným rizikem aterosklerózy a atherotrombózy. Naše hypotéza - skupina s prokázaným akutním koronárním syndromem a angiograficky potvrzenou koronární nemocí bude mít vyšší výskyt těchto genetických polymorfizmů než kontrolní skupina s normálním koronarogramem.

Cíl: Pomocí komerčně dostupných kitů zjistit výskyt vybraných genetických polymorfizmů spojených s vyšším rizikem aterosklerózy a atherotrombózy u pacientů s akutním koronárním syndromem (AKS) a porovnat je se skupinou pacientů s normálním koronarogramem (kontrola).

Materiál a metody: Metodika: odběr krve do zkumavky s EDTA, izolace a amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), reverzní hybridizace, detekce a porovnání prevalence vybraných polymorfizmů použitím CVD-A StripAssay (ViennaLab GmbH) pro aterosklerózu (geny pro apolipoprotein B, lidský destičkový antigen 1 (integrin 3), angiotensin-konvertující enzym, lymfotoxin alfa a dva polymorfizmy v genu pro endoteliální NO syntasu). Detekce vybraných polymorfizmů použitím CVD-T StripAssay (ViennaLab GmbH) pro atherotrombózu (geny pro faktor XIII, protrombin, inhibitor aktivátoru plazminogenu typ 1 a dva polymorfizmy v genech pro faktor V, MTHFR a endoteliální receptor proteinu C). Identifikované polymorfizmy byly porovnány mezi skupinami.

Výsledky: V rámci aterosklerózy ve skupině AKS 46 pacientů, 33 mužů, věk 68±14 let; kontrola 49 pacientů s chlopenní vadou, KMP, thorakalgiemi, 22 mužů, věk 66±12 let. Ve skupině AKS byli častěji diabetici (33% vs 8%, p<0,001) a kuřáci (37% vs 16%, p<0,01). Následně jsme provedli genetickou analýzu zaměřenou na atherotrombózu u 14 pacientů se STEMI ze skupiny AKS, 10 mužů, věk 58±14 let a u 15 pacientů z kontrolní skupiny, 6 mužů, věk 68±11 let. Ve skupině AKS byli častěji kuřáci (57% vs 13%, p<0,05), v kontrolní skupině hypertonici (80% vs 43%, p<0,05) a dyslipidémie (73% vs 35%, p<0,05).

Dle genetické analýzy se ve skupině AKS vyskytoval častěji polymorfizmus pro gen protrombinu (p<0,05) a MTHFR C677T (p<0,10). Tyto výsledky však nebyly významné po adjustaci na konvenční rizikové faktory.

Závěr: V našem souboru byla prevalence polymorfizmů v soulase s literárními daty. Nepotvrdili jsme, že by detekce uvedených rizikových polymorfizmů pomocí komerčně dostupných kitů byla přínosem pro stanovení predispozice pacientů k AKS či k akcelerované koronární ateroskleróze. Přítomnost polymorfizmů, ani jejich akumulace, neznamená automaticky klinickou manifestaci.

Podpora projektu: IGA MZ NS 10633-3/2009 a VZ č. 2373601

P-20. ANALÝZA PORUCH ACIDOBÁZICKÉ ROVNOVÁHY (ABR) U PACIENTŮ S DEKOMPENZOVANOU JATERNÍ CIRHÓZOU – KLASICKÝ A KVANTITATIVNÍ STEWARTŮV-FENCLŮV PŘÍSTUP (SFP)

Lůžková J.², Matoušovic K.¹, Lůžek B.³

¹Interní klinika 2. LF UK a FN Motol; ²2.LF UK; ³Interní oddělení I, Krajská zdravotní, a.s. - Nemocnice Most, o.z.

Pregraduální student

Školitel: prof. MUDr. Matoušovic Karel, DrSc.

Úvod: Regulace stavu ABR je přičítána ledvinám a plicím, ale denní produkcí 1000 mMol HCO₃ se na této regulaci uplatňují i játra. Je také známo, že rozvrat vnitřního prostředí při jaterní insuficienci je provázen poruchami ABR.

Cíl: Analyzovat odchylky ABR u pacientů s dekompenzovanou jaterní cirhózou klasickou metodou a novějším SFP.

Materiál a metody: Stav ABR jsme zhodnotili u 6 pacientů s pokročilou cirhózou jater (věk 53 – 73 let; 4 muži, 2 ženy) oběma přístupy.

Konvenční přístup je založený na hodnocení pH, pCO₂, [HCO₃⁻] a AG (anion gap) korigovaného na albumin (AG_{korig}). Umožňuje klasifikovat odchylky ABR na respirační a metabolické, podstatu metabolické odchylky však odhalí jen rámcově.

SFP vychází z principu elektroneutality. Metabolická složka ABR je dle tohoto přístupu výsledkem jednak rozdílu nábojů mezi silnými kationty a anionty (strong ion difference, SID=[Na⁺]+[K⁺]+[Ca²⁺]+[Mg²⁺]-[Cl⁻]-[UA⁻], [UA⁻] je koncentrace neurčených silných aniontů), jednak celkovou koncentrací slabých neprchavých aniontů, tj. nábojem neseným albuminem a anorganickým fosfátem [Atot⁻].

Výsledky: Klasické hodnocení:

5/6 pacientů mělo pH v normě, jeden nad horní hranici normy při metabolické acidemii a respirační alkalemii. Celkově měli 3/6 pacientů snížený [HCO₃⁻] při zvětšeném AG_{korig}, zvětšený AG_{korig}, mělo 6/6 pacientů, 2/6 měli snížený pCO₂.

SFP hodnocení:

6/6 pacientů mělo snížené SID, na čemž se u 1/6 podílelo snížené [Na⁺], u 1/6 snížené [K⁺], u 2/6 snížené [Ca²⁺], u 1/6 snížené [Mg²⁺], 1/6 měl snížené a 1/6 zvýšené [Cl⁻] a 6/6 mělo zvýšené [UA⁻] při zvýšeném laktátu. [Atot⁻] bylo u všech pacientů sníženo v důsledku nízké [Alb⁻]. Prokázali jsme významnou korelaci mezi SID a [HCO₃⁻] (r=0,9556, P<0,01) a mezi [HCO₃⁻] a pCO₂ (r=0,9534, P<0,01). Vztah mezi AG_{korig} a [UA⁻] nebyl signifikantní (r=0,7400). Je zřejmé, že [UA⁻] je přesnějším vyjádřením běžně nestanovovaných aniontů než AG_{korig}.

Závěr: Odchylky ABR u pacientů s dekompenzovanou jaterní cirhózou byly charakterizovány metabolickou acidemií při sníženém SID, především v důsledku zvýšení [UA⁻]. Snížení SID bylo kompenzováno snížením [Atot⁻] a u některých pacientů i snížením pCO₂. Zhodnocení stavu ABR klasickým přístupem je spolehlivé jen tehdy, když se AG koriguje na hladinu albuminu. Hodnota [HCO₃⁻] je součtem různých veličin, které samy o sobě mohou směřovat k acidóze či alkalóze, ale ve výsledku se vyrovnávat, takže pH může být navzdory těmto odchylkám v normě. SFP umožňuje detailně posoudit tyto odchylky a exaktně je korigovat.

Podpora projektu: Grant IGA NT11081

P-21. 3D POČÍTAČOVÉ PLÁNOVÁNÍ A REKONSTRUKCE U GORLIN GOLTZOVA SYNDROMU

Hubáček M.¹, Dostálová T.¹, Mahdian N.¹, Daněk J.², Nedoma J.³

¹Stomatologická klinika dětí a dospělých UK 2.LF a FN v Motole, Praha; ²Katedra matematiky Západočeské univerzity, Plzeň; ³Ústav informatiky AV ČR, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Dostálová Tatjana, DrSc., MBA

Úvod: S rozvojem zobrazovacích metod a počítačových technologií začíná mít v medicínských oborech matematické modelování čím dál větší význam. Může být velmi přínosné pro lepší pochopení biomechaniky při zatěžování kostí, kloubů a dalších tkání. Toto platí jak pro zdravou tkáň tak i pro oslabenou nějakým patologickým procesem - cystou, nádorem, zlomeninou.

Cíl: Cílem studie je na základě 3D počítačového zobrazení zjistit matematickým modelem predilekční místa poškození čelisti patologickým procesem - keratocystou u Gorlin Goltzova syndromu. Dále pak za využití téhož matematického modelu cíleně směřovat rehabilitaci k urychlení kostní remodelace patologických kostních defektů po operační léčbě.

Materiál a metody: Zaměřili jsme se v konkrétním případě na získání matematického modelu, který by adekvátně popisoval síly v čelistních kostech u pacienta s keratocystou. Při modelování jsme vycházeli z 3DCT před a 1 rok po operaci. Numerické výsledky jsou založeny na teorii semi-koercivního jednoduššího kontaktního problému v lineární elasticitě.

Výsledky: Z výsledků jasně vyplývá, že u pacienta došlo po operaci ke změnám rozvržení sil. Při dlouhodobém sledování byly patrné známky kostní regenerace dle předpokládaného modelu, dle kterého jsme řídili rehabilitaci využitím intenzity žvýkacích sil. Součástí modelování bylo i zobrazení zatížení v tlaku a tahu u pacienta s oslabenou kostí a vytypování predilekčních míst patologické zlomeniny.

Závěr: Díky 3D matematickému modelování jsme schopni s poměrně velkou přesností určit místa největšího přetížení ve spojitosti s funkčním zatížením čelistí při žvýkání. Toho lze pak využít při vlastní léčbě - operaci a ev. rekonstrukci kostního defektu, a předcházet tak komplikacím (patologickým zlomeninám). Dále jsme prokázali, že matematický model lze využít při kontrole terapie a funkční remodelaci kostní tkáně včetně úponových míst žvýkacích svalů (odstupňovaným selektivním dávkováním mastikační zátěže).

P-22. ROLE PŘIROZENÉ IMUNITY V PATOGENEZI DIABETU MELLITU 1.TYPU

Kayserová J.¹, Včeláková J.², Dudková E.¹, Štechová K.², Šumník Z.², Koloušková S.², Hromádková H.¹, Ulmannová T.², Špíšek R.¹, Šedivá A.¹

¹Ústav imunologie, UK 2. LF a FN Motol, Praha; ²Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Anna Šedivá, D.Sc.

Úvod: Diabetes mellitus 1.typu (T1D) je autoimunitní onemocnění s progresivní destrukcí β -buněk pankreatu a poruchou produkce insulinu, v jehož patogenезi se uplatňují především T lymfocyty. Poslední studie ale potvrzují i roli vrozené imunity na vzniku T1D.

Cíl: Naším cílem bylo stanovit rozdílnou reaktivitu dendritických buněk po stimulaci různými ligandy Toll-like receptorů u pacientů s T1D.

Materiál a metody: Vyšetřili jsme 59 pacientů s T1D: 46 pacientů s čerstvým záchytem T1D, 13 pacientů s dlouhodobě kompenzovaným T1D, 58 prvostupňových příbuzných (rodič, sourozenec, dítě) a 63 zdravých kontrol bez autoimunitního onemocnění, i s negativní rodinnou anamnézou na autoimunitní onemocnění. Skupinu příbuzných jsme dále stratifikovali na základě positivity diabetogenních autoprotilátek v séru (anti-GAD65, anti-IA-2) do 2 podskupiny. DC v periferní krvi jsme stanovili pomocí kombinace monoklonálních protilátek pomocí FACS Aria. Periferní mononukleární buňky jsme stimulovali různými TLR ligandy a pomocí Luminex kitů jsme stanovili koncentraci cytokinů v supernatantech.

Výsledky: Signifikantní nižší počet myeloidních DC i plasmacytoidních DC byl nalezen mezi pacienty s T1D (106/L, mean \pm SD: mDC 11.3 \pm 7.0; pDC 7.1 \pm 7.0) a jejich prvostupňovými příbuznými (mDC 14.2 \pm 6.3; pDC 8.8 \pm 5.9) ve srovnání se zdravými kontrolami (mDC 18.3 \pm 9.1; pDC 13.4 \pm 7.9), (p<0,01, resp. p<0,05). mDC v podskupině příbuzných s pozitivními autoprotilátkami (12.3 \pm 5.9) byly signifikantně nižší než u zdravých kontrol (18.3 \pm 9.1; p<0.01), obdobný trend jsme pozorovali i v porovnání s příbuznými bez autoprotilátek (9.1 \pm 8.8, p=0.139). Pacienti s T1D i jejich příbuzní produkovali signifikantně zvýšené množství IFN α po stimulaci TLR 9 (pg/mL, mean \pm SD: 793.6 \pm 1086.0; resp. 897.9 \pm 916.3) v porovnání se zdravými kontrolami (158.9 \pm 165.1; oba p < 0.01).

Závěr: Naše studie prokázala početní i funkční změny v subpopulacích DC v periferní krvi, především pDC, u pacientů s T1D a jejich prediabetických příbuzných. Naše data podporují teorii o patogenезi T1D, že infekce, rizikový faktor T1D, je schopna u geneticky predisponovaných jedinců vyvolat imunitní reakci, aktivaci pDC, jejich přesun do lymfatických uzlin a produkci IFN α , který následně přispívá k destrukci β -buněk a vzniku T1D.

Podpora projektu: Práce byla podpořena IGA NT/11407-5 a GACR P302/10/1679.

P-23. IMPAIRED GROWTH DURING CHILDHOOD IN PATIENTS WITH PRIMARY CILIARY DYSKINESIA

Svobodová T.¹, Djakow J.¹, Zemková D.¹, Cipra A.², Pohunek P.¹ and Lebl J.¹

¹Department of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital; ²Department of Paediatrics, Masaryk Hospital, Usti nad Labem

Supervisor: Prof. Petr Pohunek, M.D., Ph.D.

Introduction: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a congenital condition leading to early-onset symptoms of recurrent/chronic respiratory infections, resulting in chronic inflammation and potentially in chronic pulmonary disease with bronchiectases and possibility of developing respiratory insufficiency in subsequent age.

Aims: Our phenotypic study aimed to analyse the statural growth in a cohort of clinically diagnosed children and young adults with primary ciliary dyskinesia.

Materials and Methods: We analysed the statural growth of 30 children and young adults with PCD aged 1.5-24 years (median 14.5) diagnosed with the disease at the age of 0.5-17 years (median 8) and compared them to the reference growth data of the background population. Of these, eight subjects carried pathogenic mutations in either DNAH5 or DNAI1 gene.

Results: In children with PCD the body height (expressed as standard deviation score; SDS) progressively decreased from $+0.46 \pm 0.24$ SDS (mean \pm SEM) at their 1st birthday, $+0.08 \pm 0.22$ SDS at 3 years and -0.21 ± 0.22 SDS at 5 years, to -0.52 ± 0.21 SDS ($p=0.02$ vs. 0) at 7 years, -0.71 ± 0.23 SDS ($p=0.007$ vs. 0) at 9 years, -0.54 ± 0.24 SDS ($p=0.04$ vs. 0) at 11 years, and to -0.56 ± 0.26 SDS ($p=0.04$ vs. 0) at 13 years. This reflects low growth velocity during the childhood growth period. Thereafter, the height stabilised and did not differ from the background population up to the age of 17 years. The growth deterioration was not dependent on sex, selected clinical signs or symptoms, the disease severity or the occurrence of pathogenic mutations in the DNAH5 or DNAI1 genes.

Conclusions: We conclude that PCD leads to chronic wasting with significant growth deterioration during childhood.

Support: Supported by Ministry of Health, Czech Republic - the Internal grant agency project (No. NT11469-5) and the project for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol).

P-24. CHIRURGICKÁ SÍŤKA FUNKCIONALIZOVÁNA POMOCÍ NANOVLÁKEN A RŮSTOVÝCH FAKTORŮ PRO OPERATIVNÍ ŘEŠENÍ INCIZIONÁLNÍ KÝLY.

Plencner M.^{1,2}, East B.³, Prosecká E.^{1,2}, Rampichová M.^{1,2}, Buzgo M.^{1,2}, Míčková A.^{1,2}, Benešová J.^{1,2}, Hoch J.³, Amler E.^{1,2}

¹Ústav lékařské biofyziky, 2. LF UK v Praze; ²Laboratoř tkáňového inženýrství, ÚEM AVČR, v. v. i., Praha; ³Chirurgická klinika, 2. LF UK v Praze

Školitel: Prof. RNDr. Evžen Amler, CSc.

Úvod: Kýla v jizvě ani dnes nepatří k vyřešeným chirurgickým otázkám. V současné době se pro reparaci incizionální kýly využívá implantace různých druhů chirurgických sítí, které však nesnižují riziko recidivy, pouze jí o 2-3 roky oddalují. Pro zlepšení vlastností používaných sítí je možná jejich kombinace s materiály tkáňového inženýrství. Nanovláknenné nosiče se jeví jako vhodné pro využití v mnoha aplikacích hojení a regenerace tkání. Nanovláknna z polykaprolaktonu (PCL) jsou vhodným materiálem pro osazení např. fibroblasty. Přítomnost buněk na nosiči by měla podpořit reparaci tkáně v místech přichycení sítěk k okraji defektu a zabránit rekurenci onemocnění.

Cíl: Cílem projektu byla příprava a testování biokompatibilní funkcionalizované sítěky pokryté vrstvou PCL nanovláken s obsahem růstových faktorů pro operativní řešení incizionální kýly. Síťka byla testována in vitro na 3T3 fibroblastech a in vivo na modelu králíka.

Materiál a metody: Biokompatibilita sítěky a její schopnost podporovat proliferaci buněk byla prokázána in vitro pomocí konfokální mikroskopie a MTT testu. Během 28 dní byla sledována adheze buněk na síťku, jejich proliferace a viabilita.

Síťka byla implantována 27 králíkům, byla vytvořena středočárová laparotomie o délce 5cm, která byla uzavřena: 1. prostou suturou pokračujícím stehem, 2. suturou + polypropylénovou sítí (PP), 3. suturou + PP + PCL nanovláknny, 4. suturou + PP + PCL s růstovými faktory, 5. suturou + PCL nanovláknny, 6. suturou + PCL nanovláknny s růstovými faktory. Zvířata byla utrácena 6 týdnů po výkonu. Břišní stěna byla vyšetřena histologicky a měřením její biomechanických vlastností. Vyšetřována byla zejména maximální tržná síla.

Výsledky: In vitro testy potvrdili zlepšení adheze, proliferace a viability buněk kultivovaných na nosičích obsahujících PCL nanovláknna s adherovanými růstovými faktory oproti samotné PP síťce. Analýza biomechanického testování ukazuje, že nejvyšší hodnota maximální tržné síly byla naměřena u skupiny vzorků obohacených o PCL nanovláknna, která samy o sobě nemají žádnou pevnost v tahu.

Závěr: Polykaprolakton ve formě nanovláken se ukázal jako vhodný materiál pro reparaci kýly v jizvě. Jedná se o první použití uvedeného materiálu v této aplikaci.

Podpora projektu: Práce byla podpořena granty Grantové agentury Univerzity Karlovy (330611, 384311, 648112, 626012)

P-25. BENEFIČNÍ VLIV N-3 PUFA NA ROZVOJ OBEZITY U MYŠÍ KRMENÝCH DIETOU S VYSOKÝM OBSAHEM TUKU JE NEZÁVISLÝ NA CHLADOVÉ TERMOGENEZI

Janovská P.¹, Flachs P.¹, Kazdová L.², Kopecký J.¹

¹Oddělení biologie tukové tkáně, Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Praha, ²Institut klinické a experimentální medicíny Praha

Školitel: MUDr. Jan Kopecký, DrSc.

Úvod: n-3 polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LC n-3 PUFA) mají benefiční vliv na zdraví a mohou bránit v rozvoji obezity a přidružených onemocnění. Myši krmené dietou s vysokým obsahem tuku (60E%) a chované ve 20°C jsou částečně chráněné při konzumaci diety obohacené LC n-3 PUFA před akumulací tuku v těle. Tento efekt nebyl spojený s aktivací mitochondriálního odpřahujícího proteinu 1 v tukové tkáni.

Cíl: Cílem této práce bylo vyloučit závislost benefičního účinku LC n-3 PUFA na mechanismech indukovaných chladem.

Materiál a metody: Samci myšího kmene C57BL/6J byli od odstavu (4 týdny) chováni ve 30°C a krmeni standardní dietou (ST), dietou s vysokým obsahem tuku (cHF) a cHF dietou obohacenou LC n-3 PUFA (cHF+F) do 8 měsíců věku. Každý týden byla sledována tělesná hmotnost. Ve věku šesti měsíců byl stanoven celotělový energetický výdej pomocí metody nepřímé kalorimetrie (INCA, Somedic, Horby, Sweeden) a 2 týdny před koncem experimentu byl proveden intraperitoneální glukózový toleranční test. Na konci pokusu byla odebrána plazma na stanovení hladin triacylglyceridů (TG) a volných mastných kyselin (NEFA) a epididymální tuková tkáň na měření syntézy TG, de novo syntézy mastných kyselin (FA) a jejich re-esterifikace.

Výsledky: Myši krmené cHF+F měli tendenci být lehčí a měli významně sníženou velikost epididymálního tuku (cHF, 2208±144 vs. cHF+F, 1534±228; g). Myši krmené cHF+F měli zachovanou glukózovou i lipidovou homeostázu, kde n-3 PUFA normalizovaly plazmatické hladiny NEFA na hladiny, které odpovídají myším na ST (ST, 0.96±0.05 vs. cHF, 1.32±0.05 vs. cHF+F 0.94±0.07; mmol/l). Obohacení LC n-3 PUFA indukovalo lipidový metabolismus v epididymálním tuku a to zejména re-esterifikaci FA v porovnání se zvířaty na cHF (~1.5 krát).

Závěr: Výsledky této práce dokazují, že vliv LC n-3 PUFA na hromadění tuku v tukové tkáni je nezávislé na chladové termogenezi. Anti-obezogenní efekt by mohl být důsledkem indukce prázdného metabolického cyklování (re-esterifikace), které spotřebovává energii.

Podpora projektu: GAČR 301/11/0226, FP7 EU Project DIABAT

P-26. POROVNÁNÍ PŮSOBNÍ TAKROLIMU A CYKLOSPORINU NA GLUKÓZOVÝ METABOLIZMUS PO KOMBINOVANÉ TRANSPLANTACI LEDVINY A PANKREATU V POZDNÍM POTRANSPLANTAČNÍM OBD

Saudek F.¹, Jedináková T.¹, Lipár K.², Skibová J.³

¹Centrum diabetologie IKEM Praha; ²Transplantcentrum IKEM Praha; ³Statistické oddělení IKEM Praha

Školitel: Prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Úvod: Potenciální diabetogenní působení imunosupresní léčby má po transplantaci inzulín-produkující tkáň zcela zásadní význam.

Cíl: Cílem naší práce bylo porovnat glukózový metabolismus u diabetiků 1. typu po provedení kombinované transplantaci ledviny a pankreatu léčených dlouhodobě dvěma různými imunosupresivy: cyklosporinem a takrolimem. Druhý jmenovaný má dle výsledků některých studií větší diabetogenní efekt.

Materiál a metody: Vyšetřili jsme 26 nemocných po kombinované transplantaci ledviny a slinivky, nezávislých na exogenním podávání inzulínu, se systémovou žilní drenáží pankreatického štěpu. Všichni pacienti měli stabilní funkci štěpu u ledviny. Hodnotili jsme: lačnou glykémii, hladiny inzulínu a C-peptidu, glykovaný hemoglobin, hladiny podávaných imunosupresiv a standardní intravenózní glukózový toleranční test (IVGTT) s výpočtem koeficientu asimilace glukózy (K_G). K posouzení inzulínové senzitivity jsme použili výpočet HOMA-IR (the homeostasis model assessment). Celkovou produkci C-peptidu a inzulínu jsme hodnotili pomocí ploch pod křivkami sérových hladin v průběhu IVGTT.

Výsledky: Skupiny léčené takrolimem a cyklosporinem se vzájemně nelišily ve věku BMI a době po provedení transplantace (9,7 ± 1,9 [SD] vs. 10,9 ± 1,3 let). Nezjistili jsme významný rozdíl ve výsledcích IVGTT mezi jednotlivými skupinami. Ve skupině léčené takrolimem (n=13) měli tři pacienti diabetickou odpověď, tři pacienti porušenou glukózovou toleranci a sedm příjemců normální glukózovou toleranci. Ve skupině léčené cyklosporinem (n=13) nebyla zjištěna diabetická odpověď u žádného příjemce, porucha glukózové tolerance byla přítomna u pěti a normální glukózová tolerance u osmi pacientů. Další výsledky jsou prezentovány v tabulce.

	HbA _{1c} DCCT (%)	Lačná glykémie (mmol/l)	HOMA-IR	K _G (%/min.)	Celková produkce C-peptidu (pmol/ml/60min.)	Celková produkce inzulínu (mIU/l/60min.)
Takrolimus skupina	5,8 ± 0,41	5,05 ± 0,49	2,72 ± 2,64	1,24 ± 0,48	92 ± 47	1742 ± 1110
Cyklosporin skupina	5,7 ± 0,24	4,9 ± 0,55	2,26 ± 1,69	1,48 ± 0,53	98 ± 51	1440 ± 1093
Rozdíl	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Hladiny obou imunosupresiv byly v terapeutickém rozmezí a neměly vliv na žádný ze sledovaných parametrů.

Závěr: Použití odlišných kalcineurinových inhibitorů nemělo vliv na glukózový metabolismus příjemců ledviny a pankreatu v pozdním potransplantačním období. V rozhodování o použití cyklosporinu nebo takrolimu po transplantaci inzulín-produkující tkáň nehraje jejich působení na glukózový metabolismus zásadní roli.

Podpora projektu: MZO 00023001

P-27. FRAKCIONOVANÁ PLAZMATICKÁ SEPARACE A ADSORBCE NEOVLIVŇUJE HEMODYNAMICKÉ PARAMETRY U EXPERIMENTÁLNÍHO AKUTNÍHO SELHÁNÍ JATER

Lásziková E.¹, Pražák J.², Pantolflíček T.³, Ryska O.³, Koblihová E.³, Tyll T.¹, Ryska M.³

¹Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní péče ÚVN Praha a 1.LF UK; ²Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní péče 2.LF UK; ³Chirurgická klinika 2.LF UK a ÚVN Praha

Školitel: prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc.,MBA

Úvod: Akutní jaterní selhání (ASJ) je relativně vzácným klinickým syndromem. Kromě elevace jaterních enzymů, rozvoje encefalopatie, poruchy srážlivosti a rizika fatálních infekčních komplikací je tento syndrom doprovázen i hemodynamickou instabilitou. Mortalita onemocnění dosahuje až 80%. Léčba pomocí FPSA-fractionsovaná plasmatická separace a adsorbce(přístroj Prometheus)-je metodou, která může být v terapii onemocnění použita.

Cíl: Znodnotit vliv FPSA na hemodynamiku u experimentálního modelu ASJ na velkém laboratorním zvířeti ve srovnání s kontrolní skupinou.

Materiál a metody: Celkem u 29 laboratorních prasat bylo navozeno metodou devaskularizace s ligací a.hepatica a provedením portokavální anastomózy ASJ. Léčba pomocí FPSA byla provedena u 15 u nich, dalších 14 zvířat bylo zařazeno do kontrolní skupiny. Během pokusu jsme monitorovali v pravidelných tříhodinových intervalech hemodynamické, biochemické parametry a intrakraniální tlak. Data byla statisticky zhodnocena pomocí T-testu a Mann-Whitneovým neparametrickým testem. Za statisticky významný byl považován rozdíl $p < 0,05$.

Výsledky: V obou skupinách jsme zaznamenali signifikantní snížení indexované systémové vaskulární rezistence (SVRI) v 3.,6.,9.a 12.hodině, signifikantní zvýšení tepové frekvence (HR) a indexovaného srdečního výdeje (CI) v 6.,9. a 12.hodině v porovnání s hodnotami na začátku pokusu. Ve skupině zvířat s léčbou FPSA jsme nenašli signifikantní rozdíly středního arteriálního tlaku, indexované systémové vaskulární rezistence a laktátu ve srovnání s kontrolní skupinou. Významné snížení intrakraniálního tlaku (ICP) jsme pozorovali u skupiny s léčbou FPSA ($p < 0,05$).

Závěr: Eliminační léčba přístrojem Prometheus je podpůrnou terapií v léčbě akutního jaterního selhání do doby transplantace jater či reparační jaterního parenchymu. Naše experimentální práce léčby akutního jaterního selhání pomocí přístroje Prometheus u velkého laboratorního zvířete neprokázala signifikantní změny hemodynamických parametrů.

P-28. EFEKT MUTACE FV LEIDEN A FII G20210A NA HODNOTU PAPP-A A FβHCG PRVOTRIMESTRÁLNÍHO SCREENINGU

Raušová E., Turnovec M., Pešková M., Macek M. jr., Macek M. sr.

Ústav biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol

Školitel: Prof. MUDr. Milan Macek jr. DrSc.

Úvod: Biochemické markery prvotrimestrálního kombinovaného screeningu chromosomálních aberací – PAPP-A a fβhCG jsou úzce spojené s funkcí placenty. Podle některých studií jsou tyto hodnoty využitelné nejen ke stanovení rizika chromosomální aberace plodu, ale také k časné predikci závažných těhotenských komplikací – preeklampsie, růstové retardace plodu a předčasného porodu. Trombofilní mutace FV-Leiden a FII G20210A byly s těmito komplikacemi asociovány. Včasné zahájení sledování rizikové gravidity s cílenou léčbou antikoagulancii může zabránit dalšímu rozvoji poruchy funkce placenty.

Cíl: Cílem naší studie je srovnání koncentrace PAPP-A a fβhCG vyjádřené v na věk a váhu korigovaných MoM (multiple of median) u skupiny těhotných pacientek s hereditární trombofilii (mutací FV Leiden a FII G20210A) oproti skupině pacientek bez uvedených mutací.

Materiál a metody: Celkem byly v naší retrospektivní studii srovnány hodnoty PAPP-A a fβhCG u skupiny pacientek s heterozygotní, homozygotní konstitucí FV Leiden, heterozygotní konstitucí protrombinové mutace FII G20210A a heterozygotním stavem pro obě mutace (N=134), oproti skupině pacientek (N=1315) negativních pro obě vyšetřované mutace. Hodnota biochemických parametrů je vyjádřena v MoM korigovaných na věk a váhu pacientky. MoM byly stanoveny programem LifeCycle z hodnot naměřených v sérech těhotných pacientek metodou TRACE (časově rozlišená emise kryptátu) přístrojem Kryptor. Mutace FV Leiden a FII G20210 byly vyšetřeny z DNA izolované z periferní krve pacientky po podepsání informovaného souhlasu komerčními metodami RHA thrombo LBP a Elucigene TRP-F kitem. Data byly zpracována pomocí statistického programu Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK), s využitím t-testu s korekcí na nenormalitu. Výsledky s hodnotou p-value < 0.05 byly považovány za signifikantní.

Výsledky: V souboru pacientek s trombofilní mutací bylo patrné statisticky signifikantní snížení hodnoty PAPP-A $1,58 \pm 0,88$ u pacientek s přítomností mutace vs. u pacientek bez přítomné mutace $1,81 \pm 1,08$ ($p=0,021$). Pro hodnoty fβhCG nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl.

Závěr: V souladu se závěry již publikovaných ojedinelých prací na toto téma jsme prokázali u pacientek s pozitivitou trombofilní mutace signifikantní snížení hodnoty PAPP-A v séru těhotných pacientek na konci I. trimestru.

Podpora projektu: Podpořeno Institucionální podporou FNM (64203), projektem OPPK a CZ.2.16/3.1.00/24022 a grantem IGA NT13770

P-29. ROZDÍL V KONTROLE RIZIKOVÝCH FAKTORŮ KARDIOVASKULÁRNÍHO ONEMOCNĚNÍ U DIABETIKŮ 2.TYPU PO CÉVNÍ MOZKOVÉ PŘÍHODĚ V ZÁVISLOSTI NA KVALITĚ PÉČE

Galovcová M.¹, Adámková V.², Lánská V.³

¹Pracoviště preventivní kardiologie, IKEM; ²Oddělení lékařské statistiky, IKEM

Školitel: Doc. MUDr. Věra Adámková, CSc.

Úvod: Cévní mozkové příhody (CMP) jsou v České republice druhou nejčastější příčinou kardiovaskulárních (KV) úmrtí. V poslední době představují 6 % všech a 11 % KV úmrtí. Významně se také podílejí na nemocnosti, invaliditě a výrazných omezeních zdravotního stavu, především u starších osob. Ve snižování nemocnosti a úmrtnosti na CMP má významný vliv primární prevence, nicméně až čtvrtinový podíl recidiv na celkovém počtu CMP jistě akcentuje význam důsledné sekundární prevence CMP.

Cíl: Porovnat úroveň sekundární prevence CMP u diabetiků 2.typu léčených v odborném centru vs. v periferních ambulancích.

Materiál a metody: Na Pracovišti preventivní kardiologie jsme během let 2009-2012 vyšetřili celkem 43 diabetiků 2. typu (průměrného věku 69,1 ± 8,9 let), kteří prodělali cévní mozkovou příhodu. Jako kontrolní skupinu jsme stanovili náhodně vybraný vzorek probandů, kteří byli vyšetřeni v rámci studie post-Monica v letech 2008/2009. Celkem bylo vyšetřeno 2057 osob (průměrný věk 55,7 ± 5,5 let), z nichž bylo 231 diabetiků starších 45 let (průměrný věk 57,5 ± 2,4 let), anamnéza prodělané CMP byla prokázána u 11 z nich (průměrný věk 58,5 ± 4,5 let).

Výsledky:

	DM s CMP (n=43)	Control DM s CMP (n=11)	p	Control DM > 45 let (n=231)	p	Control (n=2057)	p
sTK (mmHg)	128,2±13,2	143,5±20,1	*	139,3±19,9	***	132,6±18,1	n.s.
dTK (mmHg)	76,8±9,0	81,7±13,5	n.s.	83,4±10,6	***	83,4±9,7	***
BMI (kg/m ²)	30,4±3,5	33,2±6,6	n.s.	33,0±5,8	***	29,1±5,4	*
Glykémie (mmol/l)	7,8±0,3	9,7±4,3	n.s.	9,0±2,9	*	5,8±1,6	***
Kouření (%)	16,3	36,4	n.s.	27,8	n.s.	29,4	n.s.

	DM s CMP (n=43)	Control DM s CMP (n=11)	p	Control DM > 45 let (n=231)	p	Control (n=2057)	p
Celkový chol. (mmol/l)	4,3±1,0	5,0±1,2	*	5,2±1,3	***	5,5±1,1	***
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,1±0,4	1,1±0,2	n.s.	1,2±0,3	n.s.	1,4±0,4	***
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,3±0,7	3,0±1,2	n.s.	3,0±1,1	***	3,3±1,0	***
Triacylglyceroly (mmol/l)	1,9±0,9	2,2±0,5	n.s.	2,4±1,9	n.s.	1,7±1,2	n.s.
Statin (%)	86,0	45,5	*	32,5	***	14,7	***

Závěr: Skupina diabetiků s anamnézou CMP léčených na našem pracovišti měla oproti ostatním skupinám významně lepší kompenzaci většiny sledovaných parametrů. Kromě vyšší lačné glykémie a obezity dosahovali tito diabetici cílových hodnot rizikových kardiovaskulárních faktorů. Kontrolní skupina diabetiků s CMP měla oproti těsně intervenované skupině horší hodnoty systolického krevního tlaku a neočekávaně velké zastoupení kuřáků, zjistili jsme u nich však uspokojivé hodnoty lipidového spektra i přes nižší užívání statinů. U všech sledovaných skupin máme jistě rezervy v kontrole rizikových faktorů, hlavně stran kontroly glykémie a hmotnosti, čímž můžeme zlepšit prognózu těchto pacientů, a snížit riziko recidivy CMP.

P-30. ADENO-ASOCIOVANÝ VIRUS JAKO VEKTOR PRO KOMBINOVANÝ PŘENOS IMUNOSTIMULAČNÍCH A SEBEVRAŽEDNÝCH GENŮ - 1+KK PRO TŘÍČLENNOU RODINU?

Jinoch P.¹, Rittich. Š.^{1,3}, Vonka V.³, Goetz P.²

¹Exbio Praha; ²Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK; ³Ústav hematologie a krevní transfuze

Školitel: Prof. MUDr. Goetz Petr, CSc.

Úvod: Genová terapie využívá dva přístupy k léčbě nádorů, buď se snaží přenosem genu zničit nádorové buňky anebo opravit pro nádor specifický genový defekt. Přímé ničení buněk nádoru lze dosáhnout vnesením sebevražedných genů, které činí nádorovou buňku citlivou k jinak netoxickým látkám. Účinek lze posílit indukci protinádorové imunitní odpovědi vnesením genů pro imunostimulační molekuly. Kombinovaný přístup klade nároky na přenosovou kapacitu vektoru, proto jsou často používány bicistronické expresní kazety a fúzní geny.

Cíl: Vytvořit expresní kazetu pro adeno-asociovaný vektor, která by obsahovala geny pro thymidin kinázu herpes simplex a pro podjednotky interleukinu-12, aniž by byla překročena maximální kapacitu vektoru (5,2 kbp). Porovnali jsme účinnost exprese genů z prvního a druhého místa v bicistronické expresní kazetě a biologickou účinnost fúzního genu pro polyprotein obsahující obě podjednotky interleukinu-12 spojené sekvencí pro rozštěpení řetězce buněčnou endoproteázou furinem.

Materiál a metody: Sestrojili jsme plazmidové DNA obsahující bicistronické expresní kazety s genem pro gfp a genem pro thymidin kinázu viru herpes simplex. Po transfekci plazmidové DNA do buněk jsme ověřovali expresi gfp ve fluorescenčním mikroskopu a expresi thymidin kinázy pěstováním buněk v selekčním mediu.

Sestrojili jsme fúzní gen pro polypeptidový řetězec obsahující obě podjednotky interleukinu-12. Expresi proteinu jsme ověřili transfekcí plazmidové DNA do buněk a detekcí proteinu v kulturačním mediu metodou ELISA. Štěpení polypeptidu buněčnou endoproteázou jsme ověřovali pomocí western blotu s imunodetekcí interleukinu-12. Biologickou aktivitu fúzního interleukinu jsme ověřovali schopností stimulovat proliferaci aktivovaných lymfocytů.

Výsledky: Bicistronické expresní kazety obsahující virové IRES dovolují společnou expresi dvou genů z jedné mRNA pod kontrolou jednoho promotoru. Translace druhého genu v pořadí je výrazně oslabena.

Exprimovaný fúzní protein obsahující obě podjednotky interleukinu-12 byl sekretován převážně v nerozštěpené formě. Důvodem pro nekompletní štěpení mohl být nedokonalý sekvenční motiv pro endoproteázu. Biologická aktivita exprimovaného proteinu byla ve srovnání s nativním interleukinem snížena.

Závěr: Sestrojili jsme sérii plazmidů pro přípravu adeno-asociovaných vektorů obsahující sebevražedný gen a geny pro imunostimulační molekuly. Plazmidy byly použity v dalších experimentech pro přípravu vektorů ke genové modifikaci nádorových buněk.

P-31. MR VOLUMETRIE AMYGDALY A HIPOKAMPU U ZDRAVÝCH OSOB

Martinkovič L.¹, Jaroš A.¹, Kalina A.¹, Hořínek D.^{2,3}, Belšan T.⁴, Marusič P.^{1,3}

¹Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol; ²Neurochirurgická klinika Philipps-Universität Marburg, Německo; ³Neurochirurgická klinika 1. LF UK a ÚVN Praha; ⁴Radiodiagnostické oddělení ÚVN Praha

Školitel: Doc. MUDr. Petr Marusič, Ph.D.

Úvod: Objem amygdaly a hipokampu je významným parametrem u pacientů s Alzheimerovou demencí, psychiatrickými onemocněními či s epilepsií temporálního laloku. Je popisována atrofie těchto struktur v porovnání s objemy naměřenými u zdravých lidí. Tyto údaje byly získány při porovnání skupinových hodnot – pro individuální odlišení je zásadním parametrem variabilita hodnot ve zdravé populaci.

Cíl: Stanovit variabilitu v objemu amygdaly a hipokampu v rámci zdravé populace a porovnat metodiku měření pomocí manuální a automatické segmentace.

Materiál a metody: Do souboru bylo zařazeno 25 zdravých dobrovolníků (12 mužů, 13 žen), praváků, ve věkovém rozmezí 23-61 let (medián 41 let). MR mozku s vysokým stupněm rozlišení (3T, T1 vážená sekvence, tloušťka řezu 1,3 mm, koronární projekce kolmá na osu hipokampu) byla provedena u všech subjektů. V koronární rovině byla provedena segmentace amygdaly a hipokampu- manuálně (software ITK-SNAP) a automaticky (software FSL-FIRST). Ve statistickém zpracování byl použit index asymetrie = $(L-R)/[(L+R)/2] \times 100 \%$ a variační koeficient = $SD/průměr \times 100 \%$.

Výsledky:

Manuální segmentace

	Objem (cm ³)	Variační koeficient (%)	Index asymetrie (%)
Hipokampus vlevo	2,70 ± 0,25	9,4	- 2,9
Hipokampus vpravo	2,78 ± 0,25	8,9	
Amygdala vlevo	1,46 ± 0,25	17,1	- 4,1
Amygdala vpravo	1,52 ± 0,24	15,6	

Automatická segmentace

	Objem (cm ³)	Variační koeficient (%)	Index asymetrie (%)
Hipokampus vlevo	3,57 ± 0,51	14,2	- 2,9
Hipokampus vpravo	3,66 ± 0,39	10,8	
Amygdala vlevo	1,43 ± 0,19	13,5	4,9
Amygdala vpravo	1,36 ± 0,22	16,3	

Objemy hipokampů vykazují v manuální i automatické segmentaci shodnou asymetrii (pravá > levá), ale v porovnání obou metod měření se liší až o 1/3 objemu. Objemy amygdal překvapivě ukazují na nekonstantnost pravo-levé asymetrie v porovnání obou metod měření.

Variační koeficient pro manuální měření hipokampu je nižší než u amygdaly.

Závěr: Výsledky ukazují na relativně vysokou variabilitu objemu měřených struktur u zdravé populace. Použitím různých metod měření – manuální nebo automatická segmentace – může dojít k významnému ovlivnění naměřených hodnot.

Podpora projektu: Podporováno GAUK 334911/2011

P-32. VLIV POHYBOVÉ TERAPIE NA ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCI U OBÉZNÍCH DIABETIKŮ 2.TYPU

Káfuňková P.¹, Kvapil M.²

¹Klinika rehabilitace FN Motol; ²Interní klinika FN Motol

Školitel: Prof. MUDr. Kvapil Milan, CSc., MBA

Úvod: Endotelialní dysfunkce je považována za důležitý faktor v rozvoji aterosklerózy, hypertenze a srdečního selhání. Kontrola průtoku krve a regulace napětí cévní stěny zahrnuje koordinovanou integraci mnoha systémů. Jednou ze složek tohoto systému je cévní endotel. Porucha endotelialní funkce je charakteristická pro celou řadu onemocnění mezi něž patří i diabetes mellitus 2. typu

Cíl: Cílem naší práce bylo zhodnotit vliv fyzické aktivity na endotelialní funkci u pacientů s diabetes mellitus 2. typu.

Materiál a metody: Soubor tvořilo celkem 43 pacientů s diabetes mellitus 2. typu na kombinované terapii, kteří byli randomizovaně rozděleni do 2 skupin. První skupina absolvovala níže popsany pohybový program, tvořilo jí 21 pacientů (10 žen, 11 mužů), průměrného věku $65,3 \pm 10,7$ let, BMI $29,5 \pm 3,4$ kg.m⁻² a WHR $0,95 \pm 0,06$, s průměrnou délkou trvání diabetu $14,5 \pm 9,9$ let. Druhá skupina pacientů byla kontrolní v počtu 22 pacientů (12 žen, 10 mužů), průměrného věku $67,4 \pm 8,4$ let, BMI $33,4 \pm 5,1$ kg.m⁻² a WHR $0,97 \pm 0,09$, s průměrnou délkou trvání diabetu $16,6 \pm 5,8$ let. Ke stanovení optimální pohybové terapie bylo pacientům provedeno zátěžové vyšetření na bicyklovém ergometru s analýzou VO₂max. Pro pohybovou terapii byl zvolen intervalový trénink, celková doba tréninku 50 minut, 2–3 × týdně po dobu dvou 3 měsíčních etap oddělených tříměsíčním individuálním tréninkem chůze. Pacienti byli komplexně interně vyšetřeni, endotelialní funkce byla hodnocena pomocí ultrazvuku na arteria brachialis

Výsledky: Endotelialní funkce vyjádřená procentuální změnou dilatace arteria brachialis byla ve sledovaném souboru statisticky významně pozitivně ovlivněna u skupiny absolvující pohybovou intervenci ($p \geq 0,05$). Statisticky významným pozitivním změnám došlo i u některých parametrů kompenzace diabetu jako BMI, hladina celkového cholesterolu, LDL a HDL, glykémie, HbA_{1c} a diastolické krevního tlaku ($p \geq 0,05$). Porovnání průměrných hodnot v kontrolní skupině před a po uplynutí stejné doby bez zařazení pohybové intervence intervalovou formou zátěže ukazuje tendenci ke zhoršení funkce endotelu a parametrů kompenzace diabetu

Závěr: Diabetes mellitus 2. typu spolu s nedostatečnou pohybovou aktivitou zasahuje do metabolismus glukózy a lipidů, což má mimo jiné i negativní důsledky na funkci endotelu. Tato studie ukázala pozitivní vliv zvolené pohybové aktivity na endotelialní dysfunkci a s ní spojená rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění u diabetiků

P-33. PORUCHY ACIDOBAZICKÉ ROVNOVÁHY V ASOCIACI SE ZMĚNOU PLAZMATICKÉHO IONTOVÉHO SPEKTRA U HEMODIAFILTROVANÝCH PACIENTŮ

Havlín J., Matoušovic K., Schůck O., Charvát J., Horáčková M.

Interní klinika FN Motol

Školitel: Prof. MUDr. Matoušovic Karel, DrSc.

Úvod: Metabolická acidóza (MAC) je nedílnou součástí pokročilého renálního selhání. Její příčinou je nepochybně retence kyselých katabolitů, účast dalších plazmatických iontů a složení dialyzačního roztoku (DR) se však v jednotlivých studiích liší.

Cíl: Pochopení příčiny MAC a její korekce eliminačními metodami je důležité při volbě DR. U intermitentně hemodiafiltrovaných (HDF) pacientů jsme proto zhodnotili acidobazickou rovnováhu (ABR) v souvislosti s koncentracemi plazmatických iontů pomocí kombinace Sigaard-Andersenovy a Stewart-Fenclovy analýzy.

Materiál a metody: U 68 chronicky on-line HDF pacientů a 19 zdravých dobrovolníků jsme stanovili plazmatické koncentrace Na^+ , K^+ , Cl^- , Pi , albuminu, kreatininu, urey a krevních plynů. Základními parametry hodnocení metabolické komponenty ABR byly SBE, běžně neměřené anionty silných kyselin (UA^-) a rozdíl Na^+ a Cl^- ($\text{Diff}(\text{NaCl})$). Složení DR odpovídalo koncentracím Na^+ 138-140, Cl^- 109-111, K^+ 2-4, Ca^{++} 1,5, Mg^{++} 0,5, acetát 3 a HCO_3^- 32 mmol/l.

Výsledky: Predialyzačně byla MAC přítomna u 34%, z nichž 84% mělo zvýšené UA^- , 30% pokles $\text{Diff}(\text{NaCl})$, 9% hyperchloremii a 65% hyponatremii. Metabolická alkalóza (MAL) byla přítomna u 9%. Průměrné pre-HDF pH bylo $7,38 \pm 0,05$, SBE $-1,5 \pm 2,8$, UA^- $7,5 \pm 3,5$, $\text{Diff}(\text{NaCl})$ $36,2 \pm 2,2$, Cl^- $102,7 \pm 3,1$, Na^+ $138,8 \pm 3$ mmol/l. Po dialýze jsme u 81% pozorovali MAL. Průměrné post-HDF pH bylo $7,45 \pm 0,05$, SBE $4 \pm 2,4$, UA^- $2,6 \pm 3,5$, $\text{Diff}(\text{NaCl})$ $36,9 \pm 2,6$, Cl^- $100,2 \pm 2$, Na^+ $137,1 \pm 1,4$ mmol/l. Průměrné eKt/V 1,69. ΔSBE signifikantně korelovalo s ΔUA^- , nikoli s $\Delta\text{Diff}(\text{NaCl})$ či ΔCl^- .

Závěr: MAC je u HDF pacientů majoritně způsobena retencí UA^- . Neprokládali jsme asociaci MAC s poklesem $\text{Diff}(\text{NaCl})$, hyponatremií či hyperchlorémií, ani intradialyzační změny SBE s těmito parametry. Minoritní příspěvek hyperfosfatémie k MAC a alkalizační efekt hypoalbuminémie se vzájemně neutralizují. Nízké procento predialyzační MAC je důsledkem mírné až středně závažné postdialyzační MAL, jejíž příčinou je kombinace vysoké koncentrace HCO_3^- v DR a efektivní eliminace UA^- , na které nelze vyloučit podíl nízké koncentrace Cl^- v DR, vyplývající z Gibbs-Donnanova efektu. K volbě koncentrace HCO_3^- v DR je proto třeba přistupovat vždy individuálně s cílem předejít nepřiměřeným výkyvům ABR a nadměrné postdialyzační MAL, která může mít řadu negativních dopadů (arytmie, hypotenze, myalgie). Domníváme se, že tohoto cíle nelze dosáhnout bez adekvátního perorálního příjmu NaHCO_3 v interdialyzační době. Posouzení vlivu koncentrace Cl^- v DR na eliminaci UA^- vyžaduje další studii.

P-34. MORPHOMETRIC ANALYSIS AND DTI OF THE AUDITORY CORTEX IN MAN – CHANGES WITH AGING

Profant O.^{1,3}, Škoch A.², Tintěra J.², Balogová Z.^{1,3}, Ibrahim I.², Syka J.¹

¹Department of Auditory Neuroscience, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic; ²MR Unit, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic; ³Dept. of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, 1st Faculty of Medicine of Charles University, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic;

Supervisor: Prof. MUDr. Josef Syka, DrSc.

Introduction: One of the most dominant cognitive declines in the ageing population represents hearing loss (presbycusis). The dominant reason for presbycusis is hypo functional inner ear with loss of outer hair cells. However, recent findings showing a deterioration in the processing of temporal features of sound as well as a decline in the speech understanding point toward central components of presbycusis.

Aims: In our study we focused on the possible changes in the auditory cortex that accompany presbycusis.

Materials and Methods: Parameters of hearing function were assessed in a group of healthy young controls (YC), a group of elderly with normal presbycusis (EC) and a group of elderly with expressed presbycusis (EP) and then their auditory system was examined using Siemens Trio 3T magnetic resonance. For Diffusion tensor imaging (DTI), tractography of auditory pathway from the inferior colliculus (IC) to HG with subsequent analysis was performed. Morphometric analysis was performed using EPI sequence. Morphometric analysis (Gray matter volume (GrayVol), area of gyral surface (SurfArea) and average thickness of gray matter (ThickAvg)) for specific ROIs (Heschl's gyrus – HG and planum temporale –PT, visual cortex) were computed

Results: Significant decrease of ThickAvg in groups EC, EP with respect to YC was found for HG and PT. The analysis showed significantly higher SurfArea on the left side with respect to the right side in HG and PT in all groups. The decrease of the GrayVol for groups EC, EP with respect to YC and higher GrayVol on the left side was in accordance with the ThickAvg and SurfArea results. Visual cortex showed only a non-significant trend in a decrease of the thickness in both EC and EP. The results from DTI indicated a tendency for increasing L1 in EC and EP with respect to YC in auditory pathway, observable to a greater extent on the right side. No differences between EC and EP were observed in any of the morphological or diffusion parameters.

Conclusions: The results demonstrate typical left-right asymmetry of the primary auditory cortex and planum temporale and indicate the degree of the age-related atrophy of these structures that does not depend on the level of hearing dysfunction and is not present to such extent in the primary visual cortex.

Support: Supported by grants 00023001 IKEM and GACR P304/10/1872

P-35. VYUŽITÍ KADAVEROZNÍHO B-T-B ŠTĚPU PRO REKONSTRUKCI PŘEDNÍHO ZKRÍŽENÉHO VAZU

Sadovský P.

Ortopedické odd. Nemocnice Č.Budějovice, a.s.

Školitel: Prof.dr.Tomáš Trč, DrSc, MBa

Úvod: Rekonstrukce LCA (Lig. cruratum ant.) je jednou z nejčastějších ortopedických operací. Ideální štěp pro rekonstrukci by měl splňovat následující kritéria:

- Stejně anatomické a biomechanické vlastnosti jako tkáň "vlastního" zkř. vazy
- Rychlé a kompletní vhojení
- Pevná iniciální fixace a mechanická pevnost
- Minimální morbidita odběru štěpu

Pro rekonstrukční operace vazy je možné použít autologní tkáň (B-T-B štěp patelárního ligamenta, šlachy hamstringů, šlacha kvadricepsu), nebo alogenní štěp kadaverozní (B-T-B štěp, štěp z Achill. šlachy, ze šlachy m. tib. anterior).

Cíl: V naší studii jsme se zaměřili na analýzu výsledků rekonstrukcí s použitím kadaverozního B-T-B štěpu. Cílem studie je prověřit, zda kadaverozní štěp je plnohodnotnou alternativou při rekonstrukci LCA.

Materiál a metody: V letech 2002 – 2012 bylo na ortoped. pracovišti v Č.B. provedeno 1.278 rekonstrukcí LCA. Z tohoto počtu bylo 701 autologních štěpů B-T-B a 473 autologních šlachových štěpů hamstringů a 104 kadaverozních štěpů.

Pro účely a cíle práce jsme analyzovaly těchto 104 operací. V 49 případech byl kadaverozní štěp použit pro primární rekonstrukci a v 55 případech pro replastiku. Prům.věk operantů byl 31,9 roku (16-54), poměr žen/muži byl 21/83.

Výsledky: Pooperační výsledek jsme hodnotily protokolem dle Lysholma, který hodnotí subjektivní pocity pacienta (bolest, pocity „vypadávání a nestability, délku bezproblémové chůze), a objektivní známky (otoky, výpotky, stabilitu, rozsah pohybu).

Jako výborný výsledek operace jsme označili pacienty s dosaženým skóre 90-100%, dobré 80-89%, dostatečné 70-79% a zbylé jako špatné.

Ve skupině autologních B-T-B štěpů jsme dosáhli následujících výsledků:

- Výborné 46,4%
- Dobré 23,6%
- Dostatečné 14,5%
- Špatné 14,5%

Ve skupině kadaverozních B-T-B štěpů jsme dosáhli následujících výsledků:

- Výborné 29,8
- Dobré 29,7
- Dostatečné 18,9
- Špatné 21,6

Analýza výsledků:

průměrná hodnota Lysholmova skóre u autologních B-T-B štěpů byla 86,9 průměrná hodnota Lysholmova skóre u autologních šlachových štěpů 84,3 průměrná hodnota Lysholmova skóre u kadaverozních B-T-B štěpů 81,9

Závěr: Hodnoty Lysholmova skóre a subjektivní hodnocení je u obou skupin obdobné. Alternativa kadaverozního štěpu pro rekonstrukci LCA je vhodná a použitelná. Kadaverozní štěp považujeme za užitečný zejména při revizních operacích. Při primárních náhradách upřednostňujeme autologní štěp před kadaverozním.

P-36. TWO-PHOTON PROCESSOR AND SENECA – THE FIRST SOFTWARE PACKAGE TO PROCESS DATA FROM TWO PHOTON CALCIUM IMAGING AT SPEEDS DOWN TO SEVERAL MS PER FRAME.

Novák O., Tomek J., Syka J.

Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Supervisor: Prof. MUDr. Josef Syka, DrSc., dr.h.c.

Introduction: In vivo two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) has established itself as a powerful tool to reveal the morphological and functional characteristics of single cortical neurons in living anesthetized animals. The output data need to be processed using an automated software toolkit. Moreover, if there exists an algorithm fast enough to allow online frame-by-frame segmentation, there will be many possibilities to immediately influence and further investigate the observed neural circuits.

Aims: Here we address the issue of developing a software package for the complete processing of data from TPLSM and the issue of developing an ultrafast image segmentation algorithm.

Materials and Methods: In vivo data were obtained from the right auditory cortex of C57/BL6 mice using an Ultima IV two-photon microscope (Prairie Tech.). Most of our software is written in MATLAB (MathWorks). The core of the segmentation algorithm was transcribed into the programming language C and is called as a MEX file. The software was evaluated on an ordinary HP Elite 7300 PC HP Elite 7300 (Intel i7 2600 3.4 GHz).

Results: We wrote a software package called Two-Photon Processor (TPP) to process TPLSM data. TPP includes 5 principal tools that enable finding cells in a reference image and proposing a suitable trajectory for a LS measurement, to identify cells in a set of full-frame data and to record intensities over time from each particular cell, to segment the outcome data from a LS experiment, to process and export the obtained calcium traces and finally to process and display 3D data. The core algorithm of the image segmentation tool is called SeNeCA (Search for Neural Cells Accelerated). Using SeNeCA, the latency between the measurement and obtaining complete information (segmentation and intensity step detection) could be reduced to several ms per one frame. Images with a resolution of 256x256 pixels and containing ~80 cells can be segmented in 6 ms, while those with a resolution of 512x512 pixels containing ~400 cells can be segmented in less than 25 ms.

Conclusions: Two-Photon Processor is the first public software package supporting the complete processing of data from two-photon microscopy (www.uemweb.biomed.cas.cz/TPP). The SeNeCA algorithm, which enables such a short latency, opens new possibilities to immediately influence and further investigate the observed neural circuits.

Support: This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic P303/12/1347 and P304/12/G069.

P-37. ROLE DIFÚZNÍHO TENZOROVÉHO ZOBRAZENÍ V DIAGNOSTICE NORMOTENZNÍHO HYDROCEFALU

Hoza D¹, Hořínek D.², Buksakowska I.³, Beneš V.², Vyhnálek M.⁴, Hort J.⁴, Nimsky Ch.⁵

¹Oddělení neurochirurgie, Městská nemocnice Dessau, Německo; ²Neurochirurgická klinika ÚVN Praha; ³Klinika radiologie 2. LF Praha Motol; ⁴Neurologická klinika 2. LF Praha Motol; ⁵Neurochirurgická klinika Univerzity Marburg, Německo

Školitel: MUDr. Daniel Hořínek, PhD.

Úvod: Alzheimerovu nemoc (AD) a normotenzní hydrocefalus (NPH) spojuje jak kognitivní deficit, tak přítomnost ventrikulomegalie. Kromě specifických změn v bílé hmotě zjišťovaných pomocí magnetické rezonance (MRI) u obou onemocnění zabývalo se jen málo studií přímým porovnáním změn hodnot difuzivity na MRI. Předkládaná studie srovnává změny v bílé hmotě u skupin pacientů s AD a NPH pomocí difúzního tenzorového zobrazení (DTI).

Cíl: Cílem je nalézt neinvazivní vyšetření s dostatečnou senzitivitou i specifitou k odlišení potenciálně dobře léčitelného NPH od demencí jiné etiologie.

Materiál a metody: Do studie bylo zahrnuto 17 pacientů s NPH, 14 s AD a 17 zdravých subjektů. Frakční anizotropie (FA), střední (MD), axiální (AD) a radiální difuzivita (RD) byly získány pomocí 3T přístroje. Měřeny byly hodnoty svazku axonálních vláken bílé hmoty hemisfér u pacientů obou skupin a zdravých kontrol (Track-based Spatial Statistics).

Výsledky: Snížená FA a zároveň zvýšená RD byly zachyceny u pacientů s NPH v corpus callosum zejména v jeho spleniu. Vyšší FA u těchto subjektů nalézáme naopak v kortiko-fugálních vláknech mířících z fronto-parietálního kortexu do zadního raménka capsula interna. Současně bylo zaznamenáno i zvýšení hodnot MD a AD.

U skupiny nemocných s Alzheimerovou nemocí nebyly naměřeny žádné změny FA. AD byla ve všech měřených oblastech lehce vyšší.

Subjekty s NPH vykazovaly oproti pacientům s Alzheimerovou nemocí vyšší hodnoty FA, MD a AD ve vláknech corona radiata periventrikulárně vycházející z fronto-parietálního kortexu a směřujících do zadního raménka capsula interna a obou thalamů.

Závěr: V uvedené práci byly pomocí DTI nalezeny změny v bílé hmotě, kterými se odlišily obě skupiny onemocnění. Touto analýzou bylo tedy možno určit diagnózu NPH či AD s dostatečnou senzitivitou na mikrostrukturální úrovni, čehož lze využít při výzkumu dalších onemocnění s patologií v bílé hmotě.

P-38. CARDIAC SUBMILISIVERT VOLUME (SCREENING) CT.

Profantova N., Belsan T., Charvat F., Krahula O.

Department of Radiology, Military University Hospital, Prague

Supervisor: Doc. MUDr. Charvat Frantisek, Ph.D.

Introduction: Exposure of patients to X-ray doses is rather high during coronary angiography.

Aims: The aim of our study is to demonstrate the possibility of radiation dose reduction during the imaging of coronary arteries by adjusting the examination parameters during CT scanning. Dynamic volume CT scanner was used to obtain images. Main advantages of this CT device and these types of scanning protocols are dose reduction, small amount of contrast medium, duration of examination, noninvasiveness.

Materials and Methods: The imaging was carried out on the CT Aquilion One with 320 row detector. 21 patients (19 males, 2 females, average age 37,5 years, heart rate $57\pm 3,7$ bpm) were examined using customized scan protocol. This protocol was based on the patient's body mass index (BMI) ($23,8\pm 1,9$). The examination parameters of the protocol (voltage 100 kV, tube current 200-570 mA, scan range 10-16 cm, rotation time 0,35 s) were adjusted for each patient.

Results: The goal was to decrease amount of radiation below 1 mSv without reduction of image quality. Based on our results, to meet this goal, the scan range is adjusted to the BMI and tube current. In our study we met our criteria in almost all patients, only one patient had BMI 30 and his radiation dose had to be increased above 1 mSv.

Conclusions: Adjustment of the examination parameters can lead to a significant reduction of radiation dose. This examination protocol can be used in certain patients, whose BMI is not too high (ideal below 26). In indicated cases, this can be used as standard protocol, which reliably shows coronary arteries.

P-39. POVRCHOVÝ PRŮZKUM HRADU SOKOLOV U CHOTĚBOŘE

Hájek J.¹, Rous P.²

¹2. lékařská fakulta UK Praha; ²Muzeum Vysočiny Havlíčkův Brod

Pregraduální student

Školitel: Mgr. Pavel Rous

Úvod: Hrad Sokolov se nachází severovýchodně od Chotěboře na skalním ostrohu nad řekou Doubravou. O existenci hradu svědčí jen několik málo písemných zmínek - první z roku 1407. Již druhá z roku 1437 uvádí Sokolov jako zříceninu.

V terénu jsou dodnes velmi dobře patrné hradní příkopy oddělující předhradí a vlastní jádro hradu, zde navíc nacházíme pozůstatky kamenného zdiva vyplněného vápennou maltou.

Cíl: Primární snahou výzkumu bylo provedení povrchového průzkumu zříceniny hradu, jeho zhodnocení a interpretace. Zároveň pak podrobné zmapování a popis hradiště a shromáždění kompletního souboru informací o Sokolovu.

Materiál a metody: Při povrchových archeologických sběrech v letech 2005 - 2012 bylo objeveno 237 střepů keramických nádob, 2 železné předměty, amorfní hrušky mazanice, kus taveniny a 5 vzorků úlomků kostí. Nálezový soubor byl podrobně rozříděn do několika rámcově datovaných skupin dle obecných kritérií a poznatků o středověké keramice z širšího Havlíčkobrodská.

Výsledky: Z celkového souboru střepů tvoří 45 zlomků tuhové a oxidačně vypálené keramiky nejstarší nalezené položky datované v intervalu od poloviny 13. století do poloviny 14. století. Nejpočetnější skupinou je 146 zlomků redukčně pálené keramiky datovatelné do průběhu 14. století. Nejspíš také ze 14. století pochází 28 zlomků zrnitého černo-šedého materiálu a z 1. poloviny 15. století pochází 16 zlomků redukční keramiky vyspělejší fáze.

Zajímavostí je výzdoba zlomků keramiky - ryté vlnovky, hraněné žebérka a především radýlková výzdoba 4 zlomků. Soubor nálezů tvoří i několik okrajů nádob, které dávají bližší představu o jejich využití.

Závěr: Zásadní význam výzkumu spočívá ve vůbec prvním provedeném archeologickém sběru na hradě Sokolově. Žádný jiný dosud proveden nebyl a jedná se vůbec o první popsané nálezy z této lokality.

Archeologické nálezy datují život hradu Sokolov do rámce vymezeného 2. polovinou 13. století a 1. polovinou 15. století. Je to významný přínos k debatě o dataci vzniku hradu. Dosavadní předpoklady hovořily o 2. polovině 14. století.

V kontextu nových poznatků o středověké Libické cestě a zjištěných dat lze usuzovat i o původní úloze hradu v ochranné a strážní funkci koridoru stezky.

P-40. CLOSTRIDIUM DIFFICILE: MOLEKULÁRNÍ EPIDEMIOLOGIE KLINICKY VÝZNAMNÝCH IZOLÁTŮ VE FAKULTNÍ NEMOCNICI MOTOL

Krůtová M.^{1,2}, Nyč O.¹, Matějková J.¹, Kuijper E.J.³, Harmanus C.³, Šolarová M.¹, Nekvasilová H.¹.

¹Ústav lékařské mikrobiologie 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole;

²DNA laboratoř kliniky dětské neurologie 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole; ³Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands

Školitel: MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.

Úvod: Clostridium difficile je významným nozokomiálním patogenem současnosti uváděným v souvislosti s post antibiotickými průjmy. Epidemiologický dohled nad výskytem v ČR není soustavně organizován. Incidence CDI (C. Difficile infection) v posledních deseti letech globálně narůstá. Molekulárně typizační metody: PCR ribotypizace a MLVA jsou v Evropě používány jako epidemiologický nástroj k monitorování výskytu a šíření CDI v rámci nemocničního zařízení. Jednotlivé ribotypy se od sebe liší svojí virulencí: kvantitou produkovaných toxinů, tendencí ke sporulaci, vyšší adhezivitě apod.

Cíl: Retrospektivní molekulárně epidemiologická analýza klinicky významných izolátů C. difficile ve FN Motol za rok 2012. Určení míry genetické příbuznosti kmenů prevalujícího ribotypu.

Materiál a metody: 50 archivovaných izolátů C. difficile z roku 2012 od pacientů s CDI hospitalizovaných ve FN Motol. Všechny izoláty byly typizovány metodou PCR ribotypizace. Míra genetické příbuznosti v rámci prevalujícího ribotypu byla stanovena porovnáním 6 VNTR úseků metodou MLVA (Multi Locus Variable Tandem Repeats Analysis).

Výsledky: PCR ribotypizací bylo dourčeno 50 izolátů C. difficile. Ribotyp 176 byl určen u 26 (52%) vzorků. Ostatní ribotypy byly zastoupeny v následujících počtech: 014-4x (4%), 017/017/1-4x (4%), 001-4x (4%), AI-12-2x(2%). Následující ribotypy byly zachyceny pouze v jednom případě: AI-9-1, AI-82/1, AI-56, 053, 023, 020, 018, 012, 404, and 479. Porovnání 6 VNTR úseků kmenů C. difficile s ribotypem 176 jsme prokázali vzájemnou genetickou příbuznost izolovaných kmenů a klonální šíření v rámci nemocnice.

Závěr: Prevalujícím ribotypem ve FN Motol je ribotyp 176. Molekulární analýza vzájemné genetické příbuznosti kmenů s tímto ribotypem potvrdila pravděpodobnost nosokomiálního přenosu. Ribotyp 176 vykazuje značnou genetickou shodu s hypervirulentním ribotypem 027, který je původcem řady epidemií v Evropě i v USA. Spektrum ostatních non 176 rybotypů zachycených ve FN Motol se shoduje s ribotypy vyskytujícími se v Evropě. Takto rozsáhlý soubor dat v ČR nebyl prozatím publikován. Získané výsledky dokumentují epidemiologickou a klinickou závažnost výskytu epidemického ribotypu ve FN Motol. Současně varují před riziky jeho dalšího šíření a ukazují na nutnost striktního dodržování pravidel kontroly CDI.

Podpora projektu: Astellas Pharma s r.o., Interní grant FNM č. 6031

P-41. CLINICAL INDEX TO EVALUATE THE RISK OF PRIMARY CILIARY DYSKINESIA IN CHILDREN

Djakow J.¹, Rozehnalová E.², Havlišová M.¹, Svobodová T.¹ and Pohunek P.¹

¹Department of Paediatrics, University Hospital Motol & 2nd Faculty of Medicine; ²Department of Psychology, Faculty of Art, Charles University

Supervisor: Prof. Petr Pohunek, M.D., Ph.D.

Introduction: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder causing mainly recurrent/chronic respiratory infections and leading to chronic pulmonary disease with the possibility of respiratory failure in young age. The diagnostics of PCD is challenging as the clinical presentation can differ in particular patients. Also the methods (as high-speed videomicroscopy or electron microscopy) to diagnose PCD are usually available only in specialized centres.

Aims: To find out if a simple clinical index can be used to differentiate the patients with high risk of PCD.

Materials and Methods: All patients with PCD diagnosed in our clinic (n=31) and all patients sent to the diagnostic centre as being suspected of PCD in 2009-2011 (n=352) were included into the study. We randomly divided the study group into 2 subgroups. The analysis subgroup was used for model preparation and hold-out group was used for subsequent cross-validation of the model. We measured quality of the test (model) by computing area under ROC curve (AUC) and discriminant validity by comparing total scores for group with or without PCD diagnosis.

Results: Our suggested clinical index included 7 yes/no questions concerning the history and clinical symptoms. One point was assigned to each yes answer. AUC for analysis subsample was 0.94, AUC for hold-out subsample 0.89. Discriminant validity was measured in whole study group by non-parametric Mann-Whitney U-test: (U=555.5, Z=-7.08, p<0.0001).

Conclusions: A simple clinical 7-item questionnaire can be used to evaluate the risk of PCD and to discriminate the patients that should be referred to specialized diagnostic centre.

Support: Supported by Ministry of Health, Czech Republic - the Internal grant agency project (No. NT11469-5) and the project for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol).

P-42. ANALÝZA KINETICKÉHO PROFILU OXIDAČNÉHO POŠKODENIA MITOCHONDRIÍ.

Kohutiar M.¹, Wilhelm J.²

¹Ústav lekárskej chémie a klinickej biochémie 2. LF UK a FN Motol; ²Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Školiteľ: prof. RNDr. Jiří Wilhelm, Ph.D.

Úvod: Mitochondrie sú trvale vystavené oxidačnému stresu. Reaktívne formy kyslíka a dusíka alterujú biomolekuly a tým menia fyziologické pochody prebiehajúce v bunke. Výskumy v nedávnej dobe popisujú významný vplyv reaktívnych molekúl kyslíka a dusíka in vivo na rozvoj civilizačných ochorení.

Cíl: Cieľom našej práce je sledovať rozsah oxidačného poškodenia mitochondrií v čase po iniciácii radikálových reakcií tert-butylhydroperoxidom (t-BuOOH) a peroxynitritom (PE).

Materiál a metódy: Experimentálne sme izolovali mitochondrie z hovädzieho srdca. PE sme syntetizovali in situ v laboratóriu. Vzorky s obsahom proteínov 10 mg/ml sme paralelne inkubovali v rade koncentrácií t-BuOOH a PE (0,05 mM; 0,2mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM a 4 mM). Zmeny sme sledovali porovnaním s kontrolami bez prídavku oxidačného činidla. Produkty oxidácie sme stanovili reakciou s kyselinou tiobarbiturovou (TBA). Zmeny v množstve TBA-reaktívnych molekúl sme analyzovali spektrofotometricky pri 532 nm.

Následne sme previedli elektroforetické delenie proteínov v paralelne inkubovaných vzorkách metódou SDS-PAGE. Rozdelené proteíny sme vizualizovali striebrom a vyhodnotili kamerovým systémom denzitometricky.

Výsledky: Vo všetkých vzorkách inkubovaných s PE sme zaznamenali zvýšenie absorbancie s maximom po 1 hodine pri koncentrácii PE 1 mM (vzostup o 452%). V 50 μ M rade sme pozorovali okamžité zvýšenie absorbancie v porovnaní s kontrolou (vzostup o 252%). Toto pozorovanie dokazuje vysokú reaktivitu PE už pri nízkych koncentráciách rádovo zhodných s koncentraciami in vivo. Najvyššie absorbancie v t-BuOOH rade sme pozorovali pri koncentrácii 4 mM (vzostup o 816%) po 24 h inkubácie a v identickom čase zníženie množstva TBA- reaktívnych molekúl v PE rade. Pozorovanie môže byť v spojitosti s doposiaľ neznámymi reakciami PE s produktmi lipoperoxidácie. Elektroforéza proteínov potvrdila zmeny v kvantitatívnom zložení proteínov po 24 hodinách inkubácie. Zaujímavé je, že vysoké koncentrácie PE významne narušujú a menia zloženie proteínov vo vzorkách. Pozorovali sme degradáciu a kvantitatívne zníženie konkrétnych frakcií proteínov v analytoch na rozdiel od paralelných vzoriek inkubovaných s t-BuOOH.

Záver: Rozdiely v trendoch nameraných parametrov naznačujú variabilitu v chemizme reakcií a vykazujú rozdielny charakter v závislosti na použítom oxidačnom činidle. PE posobí ako selektívny oxidant významnejšie zasahujúci do integrity mitochondrií na rozdiel od t-BuOOH.

Podpora projektu: Tato práce je podporovaná grantem GAČR P303/11/0298.

P-43. PŘÍTOMNOST HELICOBACTER PYLORI V HYPERTROFICKÉ LYMFATICKÉ TKÁŇI NOSOHLTANU U DĚTÍ.

Katra R.¹, Kraus J.², Pavlík E.³, Nártová E.⁴, Astl J.⁵, Kabelka Z.¹

¹Klinika ušní, nosní a krční 2. LF UK a FN Motol, Praha; ²Otorhinolaryngologické oddělení, Nemocnice Rudolfa a Stefanie, Benešov; ³Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN, Praha; ⁴Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol, Praha; ⁵Oddělení otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Nemocnice Na Homolce, Praha

Školitel: Zdeněk Kabelka, Doc. MUDr., Ph.D.

Úvod: Možný příčinný vztah *Helicobacter pylori* (HP) a extragastrointestinálních chorob je zkoumán od roku 1993. Stupeň patogenity HP je vázán hlavně na specifické faktory virulence, především toxiny, jako jsou VacA a CagA. Oblast nosohltanu u dětí, může být vystavena působení HP. Určitou mírou se může podílet i refluxní choroba jícnu. Multikanálová impedance a pH-metrie jícnu dokáže přesně monitorovat přítomnost a četnost i slabě kyselého refluxu a zároveň i výšku propagace v jícnu. Předpoklad, že HP může kolonizovat tkáň AV se dosud nepodařilo jasně prokázat.

Cíl: Hlavním cílem našeho výzkumu je zjistit, zdali se HP vyskytuje v lymfatické tkáni nosohltanu u dětí s prokázanými adenoidními vegetacemi. Náš výzkum rozšiřujeme o měření simultánní intraluminální multikanálové impedance a pH-metrie jícnu k porovnání četnosti výskytu HP u pacientů s potvrzeným refluxem.

Materiál a metody: Všichni pacienti zařazení do studie podstoupili adenotomii. Odebraný materiál je vložen do transportního media - MicrotestR M4RT. V mikrobiologické laboratoři poté probíhá analýza vzorků metodou real-time PCR s genotypizací. Používáme 3 real-time PCR TaqMan testy. U vybraných pacientů bude probíhat 24hodinová monitorace pH-impedančního profilu jícnu. Používáme šestikanálové sondy s jedním pH snímačem. Po nakalibrování přístroje (Omega-MMS) zavádíme sondu intranasální cestou. Pozici proximálního impedančního kanálu Z1 v oblasti horního jícnového svěrače ověřujeme flexibilní endonazální technikou. K vyhodnocení výsledků je používán MMS software.

Výsledky: V souboru 71 pacientů s analyzovanými adenoidními vegetacemi byla přítomnost HP prokázána v 54 případech (76%). V 17 případech (24%) byl nález HP negativní. Našli jsme 9 různých genotypů HP. Nejčastější genotyp byl VacAs1am2 (28%, 15 vzorků). GagA pozitivní kmeny byly nalezeny v 30% (16 vzorků), v nejčastější kombinaci CagA + VacAs1bm2 (13 vzorků, 81%). Vyšetření 24hodinové monitorace pH-impedančního profilu jícnu teprve probíhají.

Závěr: Naše dosavadní výsledky podporují představu, že oblast nosohltanu u dětí může být považována za mimo-žaludeční rezervoár HP. Zajímavé může být porovnání přítomnosti HP v adenoidních vegetacích s vyhodnocením 24hodinové pH-impedanční-metrie jícnu. Předpokládáme, že při potvrzení extraezofageálního refluxu může být přítomnost HP v oblasti nosohltanu zvýšená. Tento předpoklad dosud nebyl publikován.

Podpora projektu: Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) a grantem IGA MZ ČR NT/11523-6.

P-44. HLADINOVÉ KOAXIÁLNÍ ZVLÁKŇOVÁNÍ PRO MASIVNÍ PRODUKCI

Buzgo M.^{1,3,4}, Vysloužilová L.², Míčková A.^{1,3,4}, Benešová J.^{1,3,4}, Pokorná H.^{1,3,4}, Lukáš D.², Amler E.^{1,3,4}

¹Fakulta biomedicínského inženýrství, ČVUT Kladno; ²Katedra netkaných textilií, TUL Liberec; ³Ústav biofyziky, 2. LF UK, Praha; ⁴Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha

Školitel: Prof. RNDr. Evžen Amler CSc.

Úvod: Koaxiálne elektrostatické zvlákňovanie umožňuje tvorbu nanovlákných nosičov druhej generácie. Nízka produktivita ihlového zvlákňovania limituje praktické použitie koaxiálnych nanovláken v praxi.

Cíl: Cieľom projektu je vývoj novej metódy hladinového koaxiálneho zvlákňovania a overenie produktivity tejto novej metódy.

Materiál a metódy: V projekte boli pripravené modifikované elektródy pre hladinové koaxiálne zvlákňovanie. Účinnosť procesu bola overená pomocou mikroskopických a spektroskopických metód s cieľom popísať najmä koaxialitu vznikajúcich nanovláken.

Výsledky: Výsledky ukázali masívne zvýšenie produktivity koaxiálneho zvlákňovania oproti klasickému ihlovému zvlákňovaniu. Produkované nanovlákná si zachovávali koaxiálnu morfológiu, čo bolo overené použitím konfokálnej mikroskopie a sledovaním uvoľňovacích parametrov produkovanej vrstvy.

Záver: Zistenia ukazujú na skutočnosť, že hladinové koaxiálne zvlákňovanie umožňuje produkciu nanovláken štruktúry jadro/obal. Produkcia vláken je masívne zvýšená a homogenita vrstvy narastá. Metodika hladinového koaxiálneho zvlákňovania je úplne novou metodikou, ktorá umožňuje produkciu koaxiálnych nanovláken v priemyslovom objeme.

Podpora projektu: Projekt financovaný z grantov Grantovej agentúry Univerzity Karlovej č. 96610, 97110, 330611, 384311, 164010, grantom Internej grantovej agentúry Ministerstva zdravotníctva č. NT12156. Projekt bol podporený aj klastrom Nanoprogress z.p.o..

P-45. ROBOTICKY ASISTOVANÁ CHIRURGICKÁ LÉČBA JATERNÍCH CYST S POSOUZENÍM CELKOVÉ ODEZVY ORGANISMU NA OPERAČNÍ ZÁTĚŽ – PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY.

Langer D.¹, Ryska M.¹, Pudil J.¹, Lásziková E.²

¹Chirurgická klinika 2. LF UK a ÚVN Praha; ²Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. LF UK a ÚVN Praha

Školitel: Prof. MUDr. M. Ryska, CSc, Prof. MUDr. K. Cvachovec, CSc., MBA

Úvod: Od počátku třetího milénia je patrna robotizace miniinvazivních výkonů v mnoha chirurgických oborech. Indikace k použití robotické soustavy da Vinci se postupně rozšiřují včetně jaterní chirurgie.

Cíl: 1. Prezentace krátkodobých výsledků chirurgické léčby s robotickou asistencí u nemocných s cystickým onemocněním jater. 2. Analýza celkové odezvy organismu a srovnání zátěže při manuálním a roboticky asistovaném laparoskopickém výkonu.

Materiál a metody: Zhodnocení skupiny 12 nemocných, kteří na našem pracovišti podstoupili pro symptomatické cystické léze jater roboticky asistovanou operační léčbu. Porovnání získaných dat a výsledků - osobních a intraoperačních dat včetně ukazatelů hemodynamiky, biochemického vyšetření krve a údajů k hodnocení perioperační celkové zátěže pacienta vyjádřené hodnotami cytokinů, u skupiny roboticky operovaných pacientů s kontrolní skupinou nemocných, u kterých byla provedena laparoskopická cholecystektomie.

Výsledky: Soubor pacientů operovaných s robotickou asistencí tvořilo 9 žen a 3 muži průměrného věku 60 let (40 - 72 let). Operační výkony jsme u všech nemocných dokončili miniinvazivní technikou s průměrnou dobou operačního výkonu 125 minut. V polovině případů byla jaterní cysta lokalizována v pravém laloku. U tří pacientů jsme současně provedli cholecystektomii. V hodnocené sestavě nemocných jsme zaznamenali časnou pooperační komplikaci u 1 operanta (biliární leak). Žádný nemocný nezemřel. Transfúzní přípravky jsme nepodali. Ve třech případech jsme potvrdili recidivu onemocnění.

Při srovnání údajů stran věku, peroperační krevní ztráty, komplikací a délky hospitalizace nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami nemocných ($p < 0.05$). Robotická skupina pacientů nevykázala oproti kontrolní skupině statisticky signifikantní rozdíl, kromě hodnot hladin fibrinogenu třetí pooperační den ($p < 0,05$). V hemodynamických parametrech (srdeční index, centrální žilní tlak, indexovaný tepový objem, indexovaná systémová vaskulární rezistence, dodávka kyslíku ke tkáním, střední arteriální tlak - MAP, laktát, intraabdominální tlak) jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou ($p < 0,05$).

Závěr: Miniinvazivní přístup v operační léčbě cystického onemocnění jater je postupem efektivním s minimální morbiditou. Robotický systém da Vinci se významně uplatnil především v méně dostupných jaterních segmentech v podbráničním prostoru. Posuzované perioperační u obou skupin pacientů jsou v průběžných výsledcích srovnatelné.

P-46. VYŠŠÍ BMI A NIŽŠÍ HDL U DM1 MATEK ZVYŠUJÍ RIZIKO TĚHOTENSKÝCH KOMPLIKACÍ A HORŠÍHO KLINICKÉHO STAVU NOVOROZENCE

Ulmannová T.¹, Bartášková D.², Špálová I.³, Zoban P.⁴, Veselý Z.⁵, Štechová K.¹

¹Pediatrická klinika FN Motol a 2.LF UK; ²Interní klinika FN Motol a 2.LF UK; ³Gynekologicko-porodnická klinika FN Motol a 2.LF UK; ⁴Novorozenecké oddělení Gynekologicko-porodnické kliniky FN Motol a 2.LF UK; ⁵Centrum bioinformatiky 2.LF UK a FN Motol

Školitel: Doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

Úvod: Diabetes v těhotenství znamená i přes zlepšující se diabetologickou a gynekologicko-porodnickou péči stále výrazně zvýšené riziko pro matku i dítě. Mnohdy i z diabetologického hlediska dobře kompenzované matky trpí různými těhotenskými komplikacemi a jejich novorozenci mají zhoršenou poporodní adaptaci.

Cíl: V naší studii jsme se snažili identifikovat méně známé rizikové faktory těhotenství matek léčených pro diabetes 1.typu a přispět tak k dalšímu zlepšování péče o tyto pacientky.

Materiál a metody: Provedli jsme retrospektivní analýzu těhotenství žen s DM1, které byly sledovány ve FN Motol v letech 2003 až 2011. Analyzovali jsme data z 99 těhotenství, ze kterých se narodilo 96 dětí. Data pocházela z diabetologické, porodnické a neontologické dokumentace. Výsledky těhotenství byly hodnoceny z hlediska novorozence, a to s ohledem na jeho klinický stav, přítomnost vrozených vad a léčbu, kterou novorozenec vyžadoval.

Výsledky: Stav novorozence koreloval samozřejmě s HbA1c a to před těhotenstvím i ve všech trimestrech ($p < 0,01$ pro všechny); překvapivě výrazný nám však vyšel vliv BMI matky (pregestačně i v průběhu těhotenství $p < 0,01$). Naproti tomu jsme nenalezli výraznější vztah mezi přírůstkem hmotnosti matky nebo mezi jejím lipidovým profilem a stavem dítěte. Z modelu založeného na našich datech vychází, že při stejném HbA1c se snížením BMI o jedna zvýší šance, že bude novorozenec zcela bez problémů o 18%.

Nejzajímavější výsledek týkající se vlivu na matku jsme našli ve velmi signifikantním vztahu mezi HDL v průběhu těhotenství a preeklampsii. Čím vyšší byla hladina HDL, tím nižší bylo riziko rozvoje preeklampsie. Tento vztah nebyl závislý na systolickém ani diastolickém tlaku, které samozřejmě též korelovaly se vznikem preeklampsie ($p < 0,01$ pro všechny).

Závěr: Naše výsledky jasně ukazují, že je důležité soustředit se u diabetiček plánujících těhotenství nejen na HbA1c, ale je nutné normalizovat jejich hmotnost a celkový metabolický stav upravit ad maximum. Vliv BMI matky v těhotenství komplikovaném DM1 je zřejmě mnohem výraznější a hranice optima je posunuta do nižších hodnot než u zdravých matek.

Podpora projektu: Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL).

P-47. HUMORÁLNÍ IMUNITA U PACIENTŮ SE SYNDROMEM DIGEORGE

Klopperk A.¹, Grecová J.¹, Kalina T.², Šedivá A.¹

¹Ústav imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole; ²Klinika dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol

Pregraduální student

Školitel: Prof. Anna Šedivá

Úvod: Náš projekt zahrnuje kohortu 80 pacientů s diagnostikovaným syndromem DiGeorge. Zatímco situace narušené buněčné imunity těchto pacientů na podkladě dysplazie thymu různého stupně je celkem známá, tito pacienti trpí i poruchami humorální imunity ve smyslu alergií a autoimunit. Proto jsme se zaměřili na molekulu BAFF, která je produkována zejména dendritickými buňkami po stimulaci IFN-gamma a podporuje maturaci naivních a transitional B-lymfocytů na přesmyklé paměťové (switched-memory) lymfocyty, její receptor BAFF-R a změny v subpopulacích B-lymfocytů.

Cíl: Cílem projektu je ozřejmit změny v humorálním kompartmentu pacientů pomocí srovnání exprese molekuly BAFF, jejího receptoru BAFF-R a subpopulací B-lymfocytů.

Materiál a metody: K stanovení sérových hodnot BAFF u 20 pacientů a 10 zdravých kontrol jsme použili R&D Quantikine ELISA kit. BAFF-R byl stanoven u 4 pacientů a 4 kontrol pomocí průtokové cytometrie, další vzorky čekají na zpracování. Subpopulace B-lymfocytů byly vyšetřeny u 29 pacientů pomocí průtokové cytometrie a srovnány s publikovanými referenčními hodnotami.

Výsledky: Sérová hladina BAFF byla u pacientů významně zvýšena ($p < 0.05$). Exprese BAFF-R na B-lymfocytech se mezi pacienty a kontrolami významně nelišila, zatímco na T-lymfocytech byla u pacientů významně zvýšena. Subpopulace transitional B-lymfocytů byla u pacientů zvýšena ve všech věkových kategoriích, zatímco switched-memory B-lymfocyty byly ve všech věkových kategoriích sníženy.

Závěr: Humorální imunita je skutečně u pacientů závažně změněna již na molekulární úrovni. Zvýšená sérová hladina BAFF, u pacientů DiGeorge dosud nepublikovaná, podporuje přežívání a vyzrávání B-lymfocytů, ale pravděpodobně kvůli nedostatku pomoci od T-lymfocytů nedochází k přesmyku a nadměrné množství B-lymfocytů je zastaveno ve stádiu naivě/transitional. Význam změny exprese BAFF-R zůstává v tuto chvíli nedořešenou otázkou a předmětem dalšího výzkumu.

Podpora projektu: Projekt byl uskutečněn pomocí finančních prostředků z grantu IGA MZ ČR NT 13287-4/2012.

P-48. VZTAH BRÁNICE A KRČNÍ PÁTEŘE K FUNKCÍM JÍCNU

Bitnar P¹, Smejkal M², Šťovíček J³, Hlava Š³, Šulc J¹, Kolář P¹

¹Klinika RHB a TVL FNM; ²III. chirurgická klinika FNM; ³Interní klinika FNM

Školitel: prof. PaedDr. Pavel Kolář, PhD

Úvod: Množství poruch jícnu jsou tzv. poruchy funkční. Tzn. není objektivní porucha struktury a přesto pacient trpí zcela objektivními příznaky nemoci, ale vyvolavatel není znám. Nejčastější poruchy jícnu jsou poruchy horního jícnového svěrače-HJS (globus pharyngeus, dysfagie) a poruchy dolního jícnového svěrače-DJS (reflux).

Cíl: Cílem studie je zmapovat vliv poruch krční páteře a bránice na etiopatogenezi funkčních poruch jícnu

Materiál a metody: Vyšetřeno: 32 osob s gastroesofageálním refluxem (GERD) a 15 osob s globem phar. příp. funkční dysfagií horního typu.

Skupina GERD: průměrný věk 42,7 roku; 17 muži, 15 ženy

Skupina Globus (dysfagie): věk: 39 let, 9 mužů, 6 žen.

Metody vyšetření:

Spirometrie klasická; spirometrie spec.-maximální respirační tlaky (okluzní tlaky)

High resolution jícnová manometrie

Všichni pacienti skupiny GERD měli další objektivizační vyšetření: gastrokopie, Ph Metrie, impedance, atd. k ověření GERD.

Výsledky: Skupina GERD :

a) spirometrie :

- VC IN: 102 %; VC EX : 103%; IC: 110%; FEV1: 102%; PEF: 101%

b) Spec. spiro-okluzní tlaky: PI max = Průměrné snížení hodnot oproti vypočítané normě bylo 37,5% (p=2,77E-9)

PE max: dysfunkce expiračních svalů

Průměrné snížení hodnot oproti vypočítané normě bylo 20% (p=0,00172).

Změna tlaku v oblasti DJS během max. respir. manévru:

- PI max manévru: ze 7,1 mm/Hg na 62,47 mm/Hg (p=0,000003)

- PE max manévru: ze 7,1 mm/Hg na 55,42 mm/Hg (p=0,00001) .

změny tlaku v DJS při max resp. manévrech: Změna tlaku v oblasti DJS během max. respir. manévru:

- PI max manévru: ze 7,1 mm/Hg na 62,47 mm/Hg (p=0,000003)

- PE max manévru: : ze 7,1 mm/Hg na 55,42 mm/Hg (p=0,00001) .

Změny tlaku v oblasti DJS při facilitovaném bráničním dýchání: k nárůstu tlaku z průměrné klidové hodnoty DJS 7,1 mm/Hg na průměrných 42,32 mm/Hg

Posturální aktivace bránice : DJS 7,1 mm/Hg – nárůst 57,48 mm/Hg (p: 0,00001)

Změna v HJS při posturální aktivaci : HJS 56,6 mm/Hg - 91,1 mm/Hg (p: 0,001)

Skupina Globus :

Pacienti s globem mají signifikantně vyšší klidový tonus HJS. 156 mm/Hg.

Postur. aktivace = nárůst tlaku HJS 236 mm/Hg

Trakce Cp = pokles tlaku HJS 100 mm/hg

Závěr: Pacienti s GERD mají objektivní snížení síly bránice bez změny v plicních funkcích. Změna tonu DJS je závislá na aktivaci bránice. Bránice je součástí DJS. Tonus DJS se mění při změně posturální aktivity bránice i při změně dechové funkce bránice (abdominal. dýchání, max. resp. manévrech). Změna tonu svalstva Cp má signifikantní vliv na změny tonu UES. Poruchy UES tak mohou být způsobeny vertebrogeními poruchami Cp.

P-49. HETEROTOPICKÁ TRANSPLANTACE SRDCE U LABORATORNÍHO POTKANA JAKO EXPERIMENTÁLNÍ MODEL LIDSKÉ MECHANICKÉ SRDEČNÍ PODPORY

Pokorný M., Malý J.

Klinika kardiologie IKEM Praha

Školitel: MUDr. Jiří Malý, PhD.

Úvod: Srdeční selhání představuje komplexní poruchu zasahující myokard na úrovni funkční, strukturální, biochemické i genové exprese. Proces kardiální remodelace následně vyústí v terminální srdeční selhání s dilatací srdečních oddílů. Po dlouhá léta byla ireversibilita proběhlé srdeční remodelace akceptována jako fakt. Vyrůstající incidence srdečního selhání, jehož léčba již nemohla být závislá pouze na transplantaci srdce, si vyžádala hledání nových terapeutických přístupů. Zavedení mechanických srdečních podpor do klinické praxe, původně v indikaci "bridge to transplantation", přineslo mnoho revolučních poznatků. Mechanické srdeční podpory poskytují objemové a tlakové odlehčení myokardu, které umožní zvrácení proběhlých kompenzačních mechanismů. Nově byl tento proces pojmenován jako reverzní remodelace myokardu. Vhodnou kombinací mechanické srdeční podpory a farmakoterapie bylo v pilotních klinických studiích dosaženo zotavení myokardu, umožňující explantaci podpory. Cílem moderní léčby srdečního selhání je maximalizace podílu pacientů u kterých k zotavení dojde, což povede ke snížení potřeby dárců orgánů.

Cíl: Nalezení spolehlivého terapeutického postupu k úspěšnému zotavení poškozeného myokardu vyžaduje detailní prozkoumání procesu reverzní remodelace na mnoha úrovních. Jedním z úskalí této problematiky je zvolení správného načasování explantace mechanické podpory, vzhledem k faktu, že v rámci procesu reverzní remodelace může docházet vlivem odlehčení myokardu také k nežádoucí atrofii.

Cílem naší práce je v první řadě sledovat časový průběh výše uvedených procesů na experimentálním modelu a následně hledat nové metody ovlivnění atrofie.

Materiál a metody: Experimentálním modelem jsme zvolili heterotopickou transplantaci srdce u imbredního kmene laboratorního potkana (Lewis). Průběžně hodnotíme echokardiografické parametry, a po terminální anestezii v termínech 7, 14, 21 a 28 dní pak morfometrické a histopatologické údaje.

Výsledky: V první etapě jsme popsali časový průběh atrofických změn po transplantaci zdravých srdcí. V další fázi experimentu jsme obdobně sledovali remodelované štěpy dárců s uměle navozeným srdečním selháním.

Závěr: Do této chvíle získaná data poukazují na rozvoj atrofie ve všech skupinách již během prvních 14 dnů. Ve finální fázi výzkumu se budeme věnovat možnosti ovlivnění atrofie pomocí implantabilních stentů.

P-50. IMPLANTACE KARDIOVERTERŮ-DEFIBRILÁTORŮ U PACIENTŮ PO ORTOTOPICKÉ TRANSPLANTACI SRDCE - ZKUŠENOSTI IKEM V PRAZE

Bláha M.^{1,2}, Čapková V.¹, Kautzner J.¹

¹Klinika kardiologie IKEM, Praha; ²Ústav patofyziologie, II. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Josef Kautzner, CSc., FESC

Úvod: Jednou z hlavních příčin úmrtí po ortotopické transplantaci srdce (OTS) je koronární nemoc štěpu (CAV). Riziko náhlé srdeční smrti (NSS) u pacientů s CAV se považuje za významné. Implantabilní kardiovertery-defibrilátory (ICD) jsou zavedenou součástí léčby u rizikových nemocných v primární i sekundární prevenci NSS. Indikační kritéria se opírají o výsledky prospektivních randomizovaných studií. Pacienti po OTS nebyli v těchto studiích zařazeni a pro užití ICD u nich je poměrně málo údajů.

Cíl: Cílem bylo vyhodnotit výsledky léčby implantabilními kardiovertery-defibrilátory u pacientů po ortotopické transplantaci srdce v našem centru.

Materiál a metody: Provedli jsme retrospektivní analýzu všech pacientů, kteří podstoupili na našem pracovišti OTS, a poté implantaci ICD, v období od počátku 2005 (1. implantace ICD pacientovi po OTS) do září 2012.

Výsledky: Počátkem r. 2005 bylo sledováno 248 pacientů po OTS a do září 2012 byla provedena u dalších 316. Sedmi z těchto 564 pacientů byl následně implantován ICD. Šest z primární prevence NSS při dysfunkci levé komory (LK) na podkladě CAV. Sedmý ICD byl implantován ze sekundární prevence NSS nemocnému bez CAV. Byla zaznamenána 1 komplikace implantace - rozvoj hematomu v kapse přístroje s nutností revize.

Během sledování měli 2 nemocní adekvátní intervence ICD, nebyl zaznamenán neadekvátní výboj. První nemocný měl opakované výboje ICD, které přerušily potenciálně maligní komorové arytmie, zemřel 5 let po implantaci ICD na sepsi extrakardiální etiologie.

U druhého pacienta byly zachyceny epizody antitachykardické stimulace, které ukončily potenciálně maligní komorové arytmie. Po 3 měsících od implantace ICD podstoupil úspěšně opakovanou OTS. Zbýlých 5 nemocných nemělo zachycenu potenciálně maligní arytmii. Dva zemřeli dva roky po implantaci ICD. Příčinu smrti se v jednom případě nepodařilo dohledat, druhý pacient zemřel náhlou smrtí v terénu, výpis z ICD nebyl zajištěn. Zbylí 3 pacienti žijí, jeden z nich po opakované OTS.

Závěr: U nemocných s dysfunkcí LK na podkladě CAV je dle našich výsledků racionální implantovat ICD. Analýza výsledků u většího počtu nemocných dovolí podpořit tyto závěry.

P-51. VALIDACE EKG PRAVÍTKA KE SCREENINGU PRODLOUŽENÍ KORIGOVANÉHO QT INTERVALU U ZDRAVÝCH A PACIENTŮ SE SYNDROMEM DLOUHÉHO QT INTERVALU

Slabý K.¹, Procházka M.¹, Janoušek J.², Kubuš P.², Radvanský J.¹

¹Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství UK 2. LF a FN Motol; ²Dětské kardiocentrum FN Motol

Školitel: Doc. MUDr. Jiří Radvanský, CSc.

Úvod: Syndrom vrozeně prodlouženého QT intervalu (LQTS) je onemocnění způsobené dysfunkcí iontových kanálů v myokardu ohrožující na životě vznikem polymorfní komorové tachykardie typu torsades de pointes či fibrilace komor, hlavně při adrenergní stimulaci. Prevalence se odhaduje na 1:2500. Odhadem 15-20% případů náhlého netraumatického úmrtí u lidí mladších 40 let lze přičíst právě LQTS. Hraniční hodnota QTc pro záchyt LQTS v rámci screeningu byla recentně zvýšena na 470ms (muži) a 480ms (ženy). To sice zvyšuje pozitivní prediktivní hodnotu screeningu a snižuje počet falešně pozitivních záchytů, na druhé straně tyto hodnoty zvyšují již tak velký počet měření QTc s podhraničními výsledky. U těchto sportovců de facto nepotřebujeme znát přesnou hodnotu QTc, ale stačí se ujistit, že QTc je spolehlivě podhraniční

Cíl: Cílem studie bylo vyvinout EKG pravítko pro grafickou korekci QT intervalu a provést jeho validaci proti standardní metodě.

Materiál a metody: Osm lékařů se zkušenostmi s měřením QTc bylo proškolen v práci s QTc pravítkem. Poté rozměřili v náhodném pořadí celkem 72 dvojic identických standardních klidových EKG. Jednu z křivek pomocí QTc pravítka a druhou standardní metodou. Mezi křivkami bylo 26 křivek od pacientů s LQTS.

Výsledky: Celkem bylo rozměřeno 395 dvojic QTc, z nichž 11 (2,8%) bylo pomocí pravítka nesprávně klasifikováno jako kratších než 430ms. U těchto křivek bylo nesprávně klasifikováno jen jedno ze tří měření v daném svodu, navíc alespoň jedno měření u stejné křivky bylo hodnoceno jako hraniční či prodloužené. Pomocí pravítka byli správně klasifikováni všichni pacienti s LQTS.

Závěr: Inter- i intraindividuální chyba manuálního měření QTc u křivek 50mm/s a 10mm/mV se pohybuje kolem 10-20ms, při manuálním měření pravítkem se značkami po 1mm lze uvádět hodnoty nejvýše s přesností na 10ms. Po zkrácení QT o 10ms resp. 20ms, což by odpovídalo korekci nadhodnocení o 0,5 resp 1mm při manuálním měření na papíře, by se změnila klasifikace 3 resp. 8 z 11 nesprávně klasifikovaných. Zbylá špatně klasifikovaná měření by se posunula do hodnot pod aktuálními hraničními hodnotami pro screening (470 resp. 480ms). Při správném postupu měření QTc je potřeba proměřit několik komplexů. Při použití pravítka došlo vždy k misklasifikaci pouze jediného ze tří měřených komplexů, takže nemohlo dojít k falešně negativnímu výsledku screeningu. QTc pravítko s cut-off hodnotou 430ms se ukázalo být validním a spolehlivým screeningovým nástrojem pro hodnocení QTc na klidovém EKG.

Podpora projektu: Podpořeno z projektu TAČR TA2-1258.

P-52. VLIV DELECE GENŮ PIM3 A SHANK3 NA ROZVOJ HEPATITIDY U PACIENTŮ SE SYNDROMEM PHELAN-MCDERMID

Drábová J.¹, Pourová R.¹, Hedvičáková P.¹, Slámová Z.¹, Simandlová M.¹, Vejvalková Š.¹, Malíková M.¹, Kotalová R.², Novotná D.¹, Havlovicová M.¹, Sedláček Z.¹

¹Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol; ²Pediatrická klinika UK 2. LF a FN Motol

Školitel: Prof. Ing. Zdeněk Sedláček, DrSc

Úvod: Mikrodeleční syndrom 22q13.3 (syndrom Phelan-McDermid, PMDS) je charakterizován poruchou vývoje řeči, hypotonií, psychomotorickou retardací a autismem. PMDS může být způsoben prostou delecí terminální oblasti dlouhých ramen chromozomu 22, formací ring chromozomu či nebalancovanou translokací. Aberace vždy zahrnují gen SHANK3. Dva publikovaní pacienti v dětství prodělali autoimunitní hepatitidu (AIH) vyžadující transplantaci. Příčinou AIH může být jak delece samotného SHANK3, jehož produkt se podílí na autoimunitní odpovědi, tak delece genu PIM3, který je též zasažen u většiny pacientů s PMDS. Protoonkogen PIM3 kóduje serin/threonin kinázu ovlivňující proliferaci jaterních buněk. Na krysím modelu byla popsána ochranná role genu PIM3 proti jaternímu selhání.

Cíl: U 4 pacientů s PMDS jsme se rozhodli metodou array CGH (aCGH) upřesnit rozsah delece s cílem určit, zda je kromě genu SHANK3 zasažen i gen PIM3, a pomoci tak k objasnění možné role těchto dvou genů při rozvoji AIH.

Materiál a metody: K ověření rozsahu aberace byli vybráni 4 pacienti s PMDS dříve vyšetřeni metodou MPLA, kde použitý kit nepokrývá přímo gen PIM3. Analýza byla provedena metodou aCGH na celogenomových čipech s pokrytím 60 tis. nebo 180 tis. sond na genom (CytoChip, BlueGnome). Vyšetření bylo provedeno u čtyřleté dívky s ring chromozomem 22, u desetiletého chlapce, který jako jediný z celé kohorty trpí AIH, a u dvou dospělých žen s PMDS (30 a 57 let).

Výsledky: U pacientky s ring chromozomem 22 odhalila aCGH kromě 7,6 Mb dlouhé delece 22q13.3 zasahující i gen PIM3 čtyři intersticiální duplikace dlouhých ramen chromozomu 22. Jedná se tedy o intrachromozomovou komplexní přestavbu s minimálně 10 zlomovými místy. U chlapce s AIH byl rozsah delece stanoven na 1,9 Mb a zasahuje jak SHANK3, tak i PIM3. Obě dospělé pacientky mají delece v rozsahu 4,2 a 6,7 Mb, obsahující také SHANK3 i PIM3.

Závěr: U pacientky s ring chromozomem 22 jsme upřesnili rozsah delece a nově jsme detekovali další čtyři aberace na chromozomu 22. U dvou dospělých pacientek, které v dětství neprodělaly AIH, jsme upřesnili rozsah delece, která v obou případech zasahuje oba možné kandidátní geny SHANK3 i PIM3. Případy dospělých s PMDS jsou v literatuře vzácné, stejně jako pacienti s AIH. Vzhledem k tomu, že hepatitida u našeho pacienta i pacientů v literatuře je autoimunitní povahy, nelze vyloučit příspěvek defektů obou těchto genů. Nezdá se však, že by delece genu PIM3 riziko AIH významně zvyšovala.

Podpora projektu: Podpořeno projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203

P-53. INFEKCE BKV U DĚTÍ PO TRANSPLANTACI LEDVINY

Šimánková N.¹, Dušek J.¹, Vondrák K.¹, Zieg J.¹, Hubáček P.², Chadomová M.³, Škapa P.³, Seeman T.¹

¹Pediatrická klinika UK 2.LF a FNM; ²Ústav lékařské mikrobiologie UK 2.LF a FNM; ³Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2.LF a FNM

Školitel: prof.MUDr.Tomáš Seeman PhD

Úvod: Infekce BK virem (BKV) je rizikovým faktorem pro selhání štěpu u dospělých i dětských pacientů. Je nejčastějším virovým onemocněním prokázaným v biopsiích štěpu. Představuje vážný problém spojovaný s přemunosuprimováním, snahou o jeho řešení je minimalizace imunosuprese na nezbytně nutnou míru. Incidence BKV virurie u dětí po transplantaci ledviny se udává mezi 33-50 %, výskyt BKV virémie 5-16 %, prevalence biopticky prokázané BKV nefropatie mezi 5-6 %. Údaje o incidenci BK virů u dětských pacientů po Tx ledviny v ČR nejsou známa.

Cíl: Zjistit prevalenci infekce BKV u dětí po transplantaci ledviny

Materiál a metody: Soubor pacientů: 32 dětí v současné péči FNM po Tx ledviny

Věk: 5 – 18 let (12,38)

Doba po transplantaci ledviny : 0,5 – 11 let (4,28)

vyšetřování vzorků krve a moči na PCR BKV

vyšetřování vzorků moči na decoy cells (marker přítomnosti BKV v uroepitelových buňkách), biopsie štěpu u dětí s persistující pozitivitou PCR BKV a klinickým podezřením na BKV nefropatii sledování dynamiky PCR BKV u pozitivních pacientů léčených snížením imunosuprese

Výsledky: Zjistili jsme PCR BKV pozitivitu v krvi u 10 dětí (31,3 %), PCR BKV pozitivitu v moči u 12 dětí (37,5 %), pozitivitu decoy cells u 10 dětí (33,3%).

Pozitivita PCR BKV pouze v moči byla zjištěna u 6 dětí (18,7%) , izolovaná pozitivita decoy cells u 1 dítěte (3,3%).

Pozitivní průkaz BKV nefropatie (PVAN) v biopsii štěpu byl prokázán u 1 pacienta (3,3 %) ze 3 bioptovaných.

Vymizení positivity BKV v krvi po dobu 1 roku sledování bylo u 8 z 10 pacientů (80%).

Závěr: Pozitivita BKV virurie nebo virémie byla prokázána u 50% dětí po transplantaci ledviny. V poměru k tomuto vysokému výskytu BKV v moči nebo séru je prevalence biopticky prokázané BKV nefropatie nízká. Pravidelné sledování BKV u dětí po transplantaci ledviny vede ke zlepšení vedení imunosuprese s vymizením positivity PCR v krvi u většiny dětí.

Podpora projektu: Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN Motol)

P-54. POUŽITÍ ADENOVIRUS-SPECIFICKÝCH CD8+ T-LYMFOCYTŮ U PACIENTA PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI KMENOVÝCH BUNĚK KRVETVORBY – PRVNÍ ZKUŠENOST

Král L.¹, Geyeregger R.², Říha P.¹, Keslová P.¹, Hubáček P.¹, Starý J.¹, Sedláček P.¹ a Fritsch G.²

¹Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF a FN Motol, Praha; ²St. Anna Kinderkrebsforschung, Children's Cancer Research Institute, Vídeň, Rakousko

Školitel: Prof. MUDr. Petr Sedláček, CSc., Doc. MUDr. Tomáš Kalina, PhD

Úvod: Adenoviry (Adv) jsou DNA viry, které u imunokompromitovaných pacientů perzistují v tlustém střevě a v močovém traktu. Pro léčbu Adv se používá cidofovir (CDV), který je výrazně nefrotoxický. Dlouhodobá protekce je zprostředkována specifickou imunitou. Při selhání CDV je možné použít Adv-specifické T-lymfocyty (Adv-T-ly), které mohou vést k rekonstituci specifické imunity.

Cíl: Zavedení buněčné terapie

Materiál a metody: Magnetická selekce Adv-T-ly pomocí Streptamerů. Krátkodobá kultivace Adv-T-ly pomocí IL15 a následná selekce. 1 pacient.

Výsledky: 6 letý pacient s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) diagnostikovanou v červnu 2009 indikován k HSCT pro relaps 17 měsíců od diagnózy. V registrech nenalezen vhodný dárce, proto indikován k transplantaci pupečnickovou krví. Od D+10 pozitivita Adv ve stolici. D+42 zahájena terapie 9 dávkami CDV v dávce 1mg/kg/dávku. Po ukončení CDV byl Adv ve stolici negativní. D+200 opět pozitivita Adv ve stolici a nově také v krvi. Proto zahájen 2. cyklus CDV. Po 3 dávkách rozvoj renální insuficience a tubulární acidózy. I přesto dokončen celý cyklus CDV. Od dne +225 vzestup kopií Adv ve stolici i v krvi, proto indikováno použití buněčné terapie pomocí Adv-T-ly. Dárce T-lymfocytů byl otec. Adv-T-ly selektovány pomocí Streptamerů ve Sv. Anně ve Vídni. Vzhledem k extrémně nízké frekvenci Adv-T-ly u dárce byla čistota finálního produktu velmi nízká – cca 1,3% Adv-T-ly. Celkem podáno 1x10⁴ CD3 T-lymfocytů/kg příjemce. Po buněčné terapii další nárůst kopií Adv v krvi, a to až na hodnoty 1x10⁹/ml. Proto podán další cyklus CDV a 2. dávka selektovaných T-lymfocytů. Zároveň zahájena krátkodobá kultivace Adv-T-ly. Od D+300 sepse nejasné etiologie se zhoršením jaterních testů, krvácením do GIT, epistaxí, podkožními hematomy a kožními nekrózami. Den +301 podána 1. dávka kultivovaných Adv-T-ly. Den +306 respirační insuficience s hypotenzí, následně multiorgánové selhání a exitus letalis. V sekčních nálezech výrazná pozitivita Adv v cílových orgánech. Vyšetřením chimerismu se neprokázala přítomnost Adv-T-ly.

Závěr: V případě rozvoje orgánového postižení (Adv nemoc) u pacientů po HSCT je prognóza velmi špatná. Současná terapie založena na podávání nefrotoxického CDV. V případě selhání je možností podání Adv-T-ly získaných magnetickou selekcí nebo kultivací. Indikace a časování podání je předmětem v současné době vznikající klinické studie, na jejímž vzniku se podílíme.

Podpora projektu: Částečně podpořeno z prostředků institucionální podpory FN Motol.

P-55. SOUČASNÉ MOŽNOSTI ORTODONTICKÉ LÉČBY U DOSPĚLÝCH PACIENTŮ

Ivanov I., Tatjana D.

Dětská stomatologická klinika FN v Motole; Privatní praxe v Praze

Školitel: prof. MUDr. Tatjana Dostálová, DrSc., MBA

Úvod: Ortodoncie a specifika vedení léčby u dospělých pacientů.

Cíl: Prezentovat stručný přehled současných technik ortodontické léčby u dospělých pacientů: vestibulární, lingvální a foliové, včetně zhodnocení možností jejich použití a úspěšnosti v klinické praxi.

Materiál a metody: Prezentace léčby (kazuistika) – 1. dvě pacientky s agenezí zubů léčené za pomoci zavedení implantátu resp. zhotovení můstku; 2. abraze pomocí keramických fazet; 3. zkřížený skus u pacientky léčený samoligujícími zámky; 4. korekce mezerovitým chrupu u dvou pacientů za použití vestibulární versus lingvální techniky.

Výsledky: U všech pacientů bylo dosaženo optimálních výsledků, a to jak v oblasti obličejové estetiky, tak i ve zlepšení funkce, okluze a artikulace chrupu.

Závěr: Za pomoci současné lékařské techniky a poznatků, s přihlédnutím k individuálním potřebám léčených osob a povaze jejich ortodontických vad, vede ortodontická léčba k požadovaným výsledkům i u dospělých pacientů.

P-56. EXPRESSION OF CARBOANHYDRASE IX IN MALIGNANT MESOTHELIOMA - AN IMMUNOHISTOCHEMICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY

Capkova L.¹, Koubkova L.², Kodet R.¹

¹Department of Pathology and Molecular Medicine; ²Department of Pneumology

Supervisor: prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

Introduction: Malignant mesothelioma is an aggressive tumour with a poor prognosis. Carbonic anhydrase IX (CAIX) is a membranously located metalloenzyme involved in pH homeostasis with influence on regulation of cell proliferation, oncogenesis and tumour progression. Much attention has been paid recently to carboanhydrases and their inhibitors as they offer an opportunity for both developing novel anticancer drugs, as well as diagnostic and prognostic tools.

Aims: This study was designed to assess the expression of CAIX in malignant pleural and peritoneal mesotheliomas, their benign counterparts, and in pleural effusions of patients with malignant mesothelioma, metastatic carcinoma or a benign disease.

Materials and Methods: Tissue blocks from 51 malignant mesotheliomas of pleura (47 cases; 41 epithelioid, 2 biphasic, 4 sarcomatoid) and peritoneum (4 cases; all epithelioid), 14 cases with normal or reactive pleural tissue, and 19 cell blocks were analyzed. CAIX expression was determined using immunohistochemistry and membranous immunoreactivity was semiquantitatively evaluated. Specimens were divided into five subgroups according to the staining pattern and intensity.

Results: Overall, 92.2% (47/51) of mesotheliomas expressed CAIX. All epithelioid mesotheliomas showed CAIX positivity, which was predominantly strong and diffuse (73.3%, 33/45). Sarcomatoid mesotheliomas and sarcomatoid areas in biphasic mesotheliomas were negative. A strong diffuse staining was observed in all cases of normal mesothelia. In pleural effusions, CAIX expression was observed in malignant as well as in benign mesothelial cells.

Conclusions: In conclusion, CAIX is expressed virtually in all mesotheliomas except for sarcomatoid subtype, and in benign mesothelia. There are probably more mechanisms of CAIX overexpression than hypoxia-induced in malignant mesothelioma, with the influence of other tissue specific transcription or growth factors depending on the type of the cell of origin. CAIX immunoreactivity is not a reliable marker in distinguishing malignant cells from benign mesothelia. Nevertheless, our data support the potential use of therapeutics targeting CAIX in patients with advanced mesothelioma.

Support: The study was supported by the project of Ministry of Health, Czech Republic for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic).

P-57. LÉČBA FENOFIBRÁTEM ZMÍRŇUJE ANGIOTENZIN II DEPENDENTNÍ HYPERTENZI CYP1A1-REN-2 TRANSGENNÍCH POTKANŮ

Varcabová Š.^{1,2}, Kopkan L.¹, Husková Z.¹, Červenka L.^{1,2}

¹Institut klinické a experimentální medicíny v Praze; ²lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Školitel: prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc. MBA

Úvod: Nedávné studie prokázaly, že 20-hydroxyeikosatetraenové kyseliny (20-HETEs), které vznikají při metabolismu arachidonové kyseliny cestou cytochromu P-450 (CYP) mají významné vazoaktivní účinky, nicméně tyto účinky jsou v mnoha ohledech protikladné. 20-HETEs působí na jednu stranu jako významná vazokonstrikční látka v periferním a obzvláště v renálním řečišti, na druhou stranu tlumí reabsorpci sodíku v renálních tubulech. V poslední době přibývá důkazů, že právě intrarenální deficit 20-HETEs významně akcentuje natriumretenční účinky renin-angiotenzin-aldosteronového systému (RAAS). A právě na základě těchto poznatků jsme představili hypotézu, že tento deficit 20-HETEs v oblasti tubulárního systému nefronu zhoršuje fungování tlakově-natriuretického mechanismu ledvin a přispívá k rozvoji hypertenze.

Cíl: Cílem naší studie bylo ověřit, zda podání fenofibrátu, a tím pádem zvýšení exprese 20-HETEs, povede ke zmírnění hypertenze díky zlepšení renálních funkcí u CYP1A1-Ren-2 transgenních potkanů.

Materiál a metody: Hypertenzi u Cyp1A1-Ren-2 potkanů jsme indukovali podáním diety s obsahem přírodního xenobiotika indol-3-carbinol (I3C, 0.3 %), které spouští masivní expresi vloženého myšního reninového genu a tím pádem rychlý rozvoj angiotenzin II dependentní formy hypertenze. Zároveň jsme potkanům podávali fenofibrát v dietě (3g/kg) po dobu 11 dní. V první části pokusu jsme sledovali vliv léčby fenofibrátem na střední arteriální tlak, systolický tlak a srdeční frekvenci pomocí telemetrických sond. V druhé části pokusu jsme prováděli akutní renální pokusy, během nichž byly potkanům měřeny bazální hodnoty středního arteriálního tlaku, průtoku krve ledvinou a odebírány vzorky moči a krve na stanovení bazálních hodnot glomerulární filtrace, vylučování sodíku a objemu vyloučené moči.

Výsledky: Po podání fenofibrátu došlo u indukovaných potkanů ke zpomalení rozvoje hypertenze a k jejímu statisticky významnému zmírnění (144 ± 5 vs. 176 ± 2 mmHg, $p < 0,001$). Léčba nevedla ke zlepšení hodnot glomerulární filtrace, průtoku krve ledvinou ani ke zvýšení natriurézy, nicméně vedla k významnému poklesu koncentrace angiotenzinu II v plasmě (94 ± 15 vs. 46 ± 9 fmol/ml, $p < 0,05$) i v ledvinách (342 ± 20 vs. 153 ± 14 fmol/ml, $p < 0,05$) u léčených zvířat.

Závěr: Naše studie ukázala, že léčba fenofibrátem zmírnila rozvoj maligní hypertenze, nicméně nebylo tomu tak na základě zlepšení renálních funkcí, ale nejspíše snížením aktivity renin-angiotenzin-aldosteronového systému.

P-58. VÝZNAM HYPOXIE A HIF-1 α PRO VZNIK CHEMOREZISTENCE U BUNĚČNÝCH LINIÍ ODVOZENÝCH OD LIDSKÉHO NEUROBLASTOMU

Maříková H.¹, Hraběta J.¹, Groh T.^{1,2}, Rahman M.A.¹, Cipro Š.³, Eckschlager T.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol Praha; ²Katedra biochemie PřF UK v Praze; ³Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2. LF a FN Motol Praha

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc

Úvod: Hypoxie je charakteristickým znakem mikroprostředí solidních nádorů. Adaptace nádorových buněk na hypoxické podmínky má řadu významných biologických dopadů, podílí se na agresivnějším chování nádorů, jejich dediferenciaci a je jednou z příčin snížení apoptózy indukované cytostatiky a zvýšení genetické nestability nádorových buněk. Hlavním faktorem, který adaptaci na hypoxické prostředí ovlivňuje, je tzv. hypoxií indukovaný transkripční faktor (HIF-1 α). HIF-1 α transaktivuje více než 100 genů, které zprostředkovávají adaptivní odpověď nádorových buněk na hypoxii. Mezi tyto geny patří například gen pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), erythropoetin (EPO) a glukosový transporter 1 (SLC2A1). Pochopení regulačních mechanismů HIF-1 α proto může mít velký význam při vývoji léčby zhoubných nádorů. Předpokládá se, že HIF a jeho kaskády jsou zodpovědné za vznik chemo- a radiorezistence hypoxických nádorových buněk.

Cíl: Cílem projektu je zjistit, jaké mechanismy jsou zodpovědné za vznik chemorezistence u buněk neuroblastomu v hypoxii, jaký podíl má na jejím vzniku transkripční faktor HIF-1 α a jakým způsobem lze tuto hypoxií indukovanou chemorezistenci potlačit.

Materiál a metody: Buněčné linie odvozené od lidského neuroblastomu – SK-N-AS, UKF-NB-4, UKF-NB-3, SH-SY5Y a IMR-32. Rezistence buněk na cisplatinu a ellipticin byla sledována MTT testem, stanovením aktivity kaspázy 3 a vazbou Annexinu V. HIF-1 α byl inhibován nízkomolekulárními inhibitory chetominem, YC-1 a LW6. Buněčná linie SK-N-AS byla transfekována siRNA. Pomocí qRT-PCR byla u transfekovaných buněk zjišťována exprese HIF-1 α cílových genů VEGFA a SLC2A1. Protein HIF-1 α byl detekován pomocí Western blotu.

Výsledky: U všech námi studovaných linií dochází i k normoxické expresi HIF-1 α . V hypoxii jsme pozorovali rezistenci na cytostatika cisplatinu a ellipticin a prokázali jsme, že inhibicí HIF-1 α je možné tuto rezistenci hypoxických nádorových buněk k cytostatikům snížit.

Závěr: Bylo prokázáno, že inhibicí HIF-1 α je možné snížit rezistenci hypoxických nádorových buněk na cisplatinu, ale ne ji zcela potlačit. Pro další sledování vlivu HIF-1 α na hypoxickou rezistenci u NBL linií se budeme snažit vytvořit stabilní linie s potlačenou expresí HIF-1 α a jeho homologu HIF-2 α . Tyto výsledky jsou nezbytné pro další studium proteinu HIF-1 α a jeho vlivu při působení cytostatik v hypoxických oblastech nádorů.

Podpora projektu: Projekt byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy GA UK 620612.

P-59. NOVOROZENECKÝ SCREENING CYSTICKÉ FIBRÓZY: PROTOKOLY ZALOŽENÉ NA STANOVENÍ PANCREATITIS-ASSOCIATED PROTEINU

Krulišová V.¹, Balašáková M.¹, Skalická V.², Piskáčková T.¹, Holubová A.¹, Štambergová A.¹, *Macek M. Jr.¹, *Votava F.³ *Oba autoři přispěli k práci stejným dílem

¹Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. LF UK a FN Motol, Praha; ²Pediatrická klinika, 2. LF UK a FN Motol, Praha; ³Klinika dětí a dorostu, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Milan Macek Jr., DrSc.

Úvod: Na základě všeobecně uznávaného souhlasu o prospěšnosti novorozeneckého screeningu (NS) cystické fibrózy (CF) byl v mnoha státech zaveden celoplošný NSCF využívající různé typy screeningových protokolů.

Protokoly založené na stanovení imunoreaktivního trypsinogenu (IRT) jako prvního a DNA analýzy (DNA) jako druhého kroku (tj. IRT/DNA) v rámci NSCF jsou považovány v současné době za zlatý standard. Nevýhody spojené s DNA analýzou jako součástí NSCF vedly k představení protokolů používajících stanovení pancreatitis-associated proteinu (PAP) jako druhý krok (tj. IRT/PAP). Kombinací obou výše uvedených protokolů jsou schémata IRT/PAP/DNA.

Současným celoplošným screeningovým schématem pro CF je v České republice od října 2009 protokol IRT/DNA/IRT.

Cíl: Cílem této práce je prezentace výsledků studie porovnávající senzitivitu a specifitu protokolů používaných v rámci NSCF. Studie probíhala ve spolupráci Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha s naším pracovištěm ÚBLG 2. LF UK a FN Motol, Praha v době od 17. 8. 2009 do 11. 1. 2011. Dále jsme představili screeningová schémata s modifikovanými cut-offy. Tato schémata byla aplikována na stejnou kohortu novorozenců jako původně testované protokoly. Získané statistické parametry byly porovnány s výsledky protokolů z původní studie a vedly k návrhům změny stávajícího celoplošného screeningového protokolu pro CF v České republice.

Materiál a metody: Pro srovnání senzitivity a specifity jednotlivých protokolů (IRT/DNA/IRT, IRT/PAP, IRT/PAP/DNA lišících se v cut-offech pro IRT a PAP) byla použita kohorta 106 522 novorozenců. Pozitivní výsledek NSCF vedl k provedení diagnostického potního testu.

Výsledky: Protokoly IRT/PAP s upravenými cut-offy pro IRT a PAP vykazují 100% senzitivitu, ale nižší specifitu. Protokoly IRT/PAP/DNA vycházející z těchto IRT/PAP protokolů dosahují vysoké senzitivity a specifity.

Závěr: IRT/PAP/DNA protokoly s modifikovanými cut-offy pro IRT a PAP dosahují vysoké senzitivity a specifity. Dále přinášejí výhodu nižších finančních nákladů oproti stávajícímu celoplošnému IRT/DNA/IRT protokolu a představují tak vhodnou alternativu pro NSCF v České republice.

Podpora projektu: CZ.2.16/3.1.00/24022OPPK, Conceptual development project of research organization #00064203 (University Hospital Motol, Prague) from the Czech Ministry of Health to M.M. Jr. and PRVOUK P31 to F.V.

P-60. AUTOLOGOUS HUMAN PERICARDIUM, A NEW APPROACH FOR HEART VALVE TISSUE ENGINEERING

Straka F¹, Schornik D², Filova E², Masin J¹, Burdikova Z³, Mirejovsky T¹, Chlup H⁴, Horny L⁴, Vesely J⁴
Pirk J¹, Bacakova L²

¹Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic; ²Department of Biomaterials and Tissue Engineering Institute of Physiology Prague, Czech Republic; ³Department of Biomathematics, Institute of Physiology, Prague, Czech Republic; ⁴Laboratory of Biomechanics, Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Czech Republic

Supervisor: Prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc.

Introduction: Several methods are possible to constructing a heart valve in the laboratory using different types of scaffolds, a variety of cells and conditioning protocols.

Aims: Our objective is to construct a living autologous human pericardial heart valve for clinical use possessing mechanical properties similar to the aortic heart valve, with a similar histological structure and remodeling potential.

Materials and Methods: Human pericardium samples were harvested during cardiac surgery and attached onto a plastic holder in the shape of the normal three cusp aortic heart valve. These scaffolds were cultured under dynamic conditions for up to four weeks. After this time conditioned pericardial samples were compared to control unconditioned pericardial samples from the same patient. Both of these tissues were compared with the normal aortic heart valve obtained during heart transplantation. Histological, immunohistochemical and biomechanical assessments were performed on all samples.

Results: Normal human pericardium consists of vimentin positive pericardial interstitial cells (PICs) that have similar properties to valvular interstitial cells (VICs). These cells are able to respond to mechanical stresses by proliferating and differentiating into an active phenotype capable of producing new extracellular matrix (ECM). This was shown by a significant increase in alpha – smooth muscle actin and Ki 67 positive cells after conditioning, as well as by increased collagen, elastin and glycosaminoglycan production. The histological structure of the conditioned pericardium is very similar to the normal aortic heart valve and dynamic conditioning was proven to be important for PIC activation. Uniaxial tensile tests were performed in order to compare the mechanical properties of conditioned pericardium with the native aortic heart valve. Our results indicate that the secant elastic modulus of pericardium before and after conditioning is comparable to the native aortic heart valve.

Conclusions: Our study demonstrated the potential of living autologous human pericardium to mimic the natural extracellular matrix structure, mechanical properties and interstitial cell phenotypic activity of the normal aortic heart valve making human pericardium a promising tissue from which to construct a living heart valve replacement. Such a pericardial heart valve possesses optimal hemodynamic properties and may be capable of remodeling and regenerating in vivo.

Support: The Grant Agency of the MH of the Czech Republic, project No. NT 11270.

P-61. ASTROCYTIC MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL ALTERATIONS IN THE PREFRONTAL CORTEX DURING THE PROGRESSION OF ALZHEIMER'S DISEASE IN THE 3XTG-AD ANIMAL MODEL

Kulijewicz-Nawrot M.¹, Syková E.^{1,2}, Verkhatsky A.^{1,3}, Rodríguez J.^{1,4,5}

¹Institute of Experimental Medicine, ASCR, Prague, Czech Republic; ²Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, 2nd Medical Faculty, Prague, Czech Republic; ³Faculty of Life Sciences, The University of Manchester, Manchester, United Kingdom; ⁴IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain; ⁵Department of Neurosciences, University of the Basque Country, Leioa, Spain.

Supervisor: Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease, which strongly deteriorates cognitive functions and memory controlled by the medial prefrontal cortex (mPFC) in strict cooperation with hippocampus and entorhinal cortex, both structures highly afflicted in AD. Astrocytes assure the internal functional equilibrium of the CNS, including the mPFC and play a key role in neuropathological processes, such as Alzheimer's disease.

Aims: Here, we analyzed astrocytic changes within the mPFC in AD by: measuring the surface and volume of the cytoskeletal glial fibrillary acidic protein (GFAP), their relation with amyloid- β deposits (A β), as well as their glutamine synthetase (GS) and glutamate transporter (GLT-1) expression.

Materials and Methods: We used quantitative confocal and light microscopy immunohistochemistry and Western blot analysis to compare transgenic (3xTG-AD) and non-transgenic animals at different ages (1 to 18 months).

Results: Transgenic animals showed clear cytoskeleton GFAP atrophy, starting from early ages (3 months; 37.93 and 48.30% decrease in surface and volume, respectively) and sustained throughout the disease progression at 9, 12 and 18 months (47.99% and 31.66%; 38.47% and 35.79%; 40.89% and 36.17%, respectively). This atrophy is independent of A β accumulation, since only a few GFAP-positive cells were present in close vicinity of A β aggregates, suggesting no direct relationship between astrocytic atrophy and A β toxicity. We also observed a decrease in GS-positive astrocytes at 1, 3, 6 and 9 months (17.38%, 11.74%, 27.21% and 27.52%, respectively) together with a reduced GS expression from 3 to 12 months of age. Interestingly, we did not observe significant changes in GLT-1 expression, despite a clear tendency to decline.

Conclusions: Our results indicate that the concomitant reduction in astrocytic branching and GS expression in the mPFC can lead to early manifested homeostatic dysfunctions, including synaptic malfunction, and result in the serious cognitive deficits observed in AD.

Support: GACR 304/11/0184, P304/12/G069, PITN-GA-2008-214003

P-62. PERICENTRICKÁ INVERZE NA CHROMOZOMU 6 U MATKY JAKO PŘÍČINA VZNIKU DUPLIKACE 6p25.3-pter A DELECE 6q25.3-qter U SYNA S VROZENÝMI VADAMI

Slámová Z., Vlčková M., Drábová J., Novotná D., Sedláček Z.

Ústav biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol

Školitel: Prof. Ing. Zdeněk Sedláček, DrSc

Úvod: K pericentrické inverzi dochází vlivem porušení chromozomu dvěma zlomy (po jednom zlomu na krátkém i dlouhém raménku), přičemž centromeru zahrnující segment mezi nimi je invertován a znovu vložen do původního chromozomu. U svých nositelů inverze zpravidla nezpůsobuje abnormální fenotyp, ale představuje riziko tvorby abnormálních gamet následkem rekombinace v oblasti invertovaného úseku, a tím i riziko poruch reprodukce či narození postižených potomků.

Cíl: Cílem práce bylo zjistit cytogenetickými a molekulárně-cytogenetickými metodami příčinu psychomotorické retardace, epilepsie, vrozených vývojových vad centrální nervové soustavy a stigmatizace u dvouletého chlapce.

Materiál a metody: U probanda bylo provedeno vyšetření metodou array CGH s využitím DNA izolované z periferní krve. U probanda i jeho rodičů bylo provedeno karyotypování na kultivovaných lymfocytech z periferní krve. Všechny nálezy byly následně ověřeny metodou FISH.

Výsledky: Celogenomové vyšetření array CGH odhalilo u probanda terminální delecii dlouhých ramen chromozomu 6 v oblasti 6q25.3-qter v rozsahu 11,3 Mb a současně terminální duplikaci krátkých ramen v oblasti 6p25.3-pter v rozsahu 92 kb. Dále byla nalezena intersticiální duplikace v oblasti 22q11.2 v rozsahu 3,1 Mb. Vyšetření rodičů prokázalo balancovanou inverzi na chromozomu 6 v oblasti p25.3q25.3 a duplikaci 22q11.2 v karyotypu matky. Karyotyp otce byl normální.

Závěr: Z výsledků vyšetření je zřejmé, že v průběhu oogeneze u matky došlo ke crossing-overu v inverzních smyčkách, následkem čehož vznikl nebalancovaný rekombinantní chromozom 6 u syna. Abnormální fenotyp probanda, zahrnující těžkou psychomotorickou retardaci, hypotonii, anomálie končetin, mikrocefalii, vývojové vady CNS a stigmatizaci, je ve shodě s dříve zjištěnými klinickými nálezy u pacientů s terminální delecí 6q. Malá terminální duplikace 6p je klinicky nevýznamná, protože zasahuje variabilní oblast bez genů. U pacientů s duplikací 22q11.2 bývá popisováno vývojové opoždění, hypotonie a neprospívání. Současně ale bývá tato aberace někdy zděděná od nepostiženého rodiče. Není vyloučeno, že se tato duplikace spolupodílí na patologickém utváření fenotypu probanda.

Podpora projektu: Podpořeno projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203.

P-63. ARRAY-CGH ANALÝZA U SVĚTLOBUNĚČNÉHO KARCINOMU LEDVINY

Chocholatý M.¹, Křepelová A.², Vasovčák P.², Babjuk M.¹

¹Urologická klinika FNM a 2. LF UK Praha; ²Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, Praha

Školitel: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc

Úvod: Karcinomy ledviny představují 2 – 3% zhoubných nádorů u dospělých. Podle histopatologické klasifikace je lze dělit na několik typů: světlobuněčný, papilární, chromofobní karcinom, karcinom z vývodných močových cest a neklasifikovatelný karcinom. Nejčastěji se vyskytuje světlobuněčný karcinom v 70 – 75%. Nejvýznamnějším genem v patogeneze světlobuněčného karcinomu ledviny je gen VHL, jehož mutace, delece, nebo ztráta exprese v důsledku metylace promotoru byly zjištěny u více než 70% světlobuněčných karcinomů ledviny. Další genetické změny v patogenezi světlobuněčného karcinomu ledviny a genetické nebo epigenetické změny podmiňující prognózu pacienta nebo predikují odpověď na terapii. V současnosti jsou předmětem výzkumu.

Cíl: Studovat genetické změny u světlobuněčného karcinomu ledviny, zjištěné změny korelovat s klinicko-patologickými nálezy.

Materiál a metody: V období 2007-2012 jsme zařadili do souboru 144 pacientů se světlobuněčným karcinomem ledviny, operovaných na Urologické klinice 2. LF UK a FN Motol. U pacientů jsme shromáždili klinická data, odebrali vzorek nádorové a nenádorové tkáně ledviny. Z odebraných vzorků jsme izolovali DNA a provedli jsme analýzu mutací genu VHL metodou přímého sekvenování PCR produktu. U 11 vzorků světlobuněčného karcinomu, u nichž jsme získali DNA dostatečného množství a kvality, jsme provedli analýzu pomocí Human CGH 3x720K Whole-Genome Tiling v. 3.0 Array a vyhodnocení pomocí SignalMap v.1.9.

Výsledky: Somatickou mutaci genu VHL jsme identifikovali u 77 (53,5 %) ze 144 pacientů. Ztrátu chromozomové oblasti 3p jsme zjistili u 11/11 nádorů, 10 z nich mělo současně mutaci genu VHL. Dále jsme zjistili ztráty na chromozomu 6 (5/11), 8 (5/11), 9 (4/11), 13 (4/11), 14 (6/11), 18 (3/11), zisky na chromozomu 5 (9/11), 7 (5/11), 12 (3/11), 16 (3/11), 20 (4/11). Ani jedna z uvedených změn se nevyskytla u dvou onkocytomů, analyzovaných jako kontrolní vzorky.

Závěr: Výsledky potvrzují zásadní význam ztráty VHL u světlobuněčného karcinomu a současně heterogenitu dalších genetických změn. Jejich jemnější charakterizace bude předmětem dalších molekulárně genetických analýz.

Podpora projektu: VZ MSM 0021620808, GAUK 104610

P-64. METALOTHIONEINY V SÉRU U DĚTSKÝCH SOLIDNÍCH NÁDORŮ – PROGNOSTICKÝ MARKER?

Kruseová J.¹, Hynek D.^{2,3}, Adam V.^{2,3}, Kízek R.^{2,3}, Průša R.⁴, Hraběta J.¹, Eckschlager T.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FNM, Praha; ²Oddělení chemie a biochemie, Zemědělská fakulta, Mendelova Univerzita, Brno; ³Centrální Evropský Institut Technologie, Technická Univerzita, Brno; ⁴Klinika biochemie a patobiochemie, 2.LF UK a FNM, Praha

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Úvod: Metalothioneny (MT) jsou nízkomolekulární proteiny bohaté na cystein, které udržují homeostázu kovů. Podílejí se na karcinogenezi a mohou být zodpovědné za vznik chemorezistence.

Cíl: V naší práci jsme sledovali vztah hladin MT v séru v korelaci s aktivitou nádorového onemocnění a s laboratorními hodnotami v průběhu onkologické léčby.

Materiál a metody: V období let 2008-2011 jsme hodnotili 865 vzorků u 172 pacientů (71 dívek a 101 chlapců) se solidními nádory. Medián věku pacientů byl 9,9 let (0,1-19,5 let). Metastatické onemocnění v době stanovení diagnózy mělo 93 pacientů (54,1%), recidivu onemocnění v době sledování mělo 12 pacientů (7%) a 32 pacientů (18,6%) zemřelo na progresi základního onemocnění. MT jsme stanovovali diferenční pulzní voltalometrií – Brdičkovou reakcí.

Výsledky: Průměrná hladina MT byla $2,7 \pm 0,5 \mu\text{M/l}$ (vs. kontrolní skupina zdravých jedinců $0,05 \mu\text{M/l}$). Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v hladinách MT u jednotlivých nádorových diagnóz ani v hladinách MT u aktivního onemocnění a onemocnění v remisi. Prokázali jsme vysoce významnou pozitivní korelaci MT a věku ($p=0,009$), dále negativní korelaci MT a kreatininu ($p=0,003$) a negativní korelaci MT a absolutního počtu lymfocytů ($p=0,001$). Pacienti s časnou recidivou onemocnění měli MT hladiny během onkologické léčby nižší proti pacientům, kteří jsou stále v kompletní remisi ($2,34 \mu\text{M/l}$ vs. $2,67 \mu\text{M/l}$, $p=0,001$).

Závěr: Tento náález může být důležitý pro klinickou praxi jako možný prognostický znak. Jsou nutné další studie pro pacienty s rizikem vzniku recidivy onemocnění.

P-65. ÚLOHA ROZEZNÁVÁNÍ POZICE VZDÁLENÉHO OBJEKTU: KOGNITIVNÍ TEST NECITLIVÝ K FARMAKOLOGICKÉMU OVLIVNĚNÍ MOTIVACE A MOTORICKÉ AKTIVITY

Levčík D., Stuchlík A., Klement D.

Fyziologický ústav AV ČR, Praha

Školitel: MUDr., Mgr. Daniel Klement, Ph.D.

Úvod: Výkonnost v kognitivních testech je ovlivněna i nonkognitivními aspekty chování, např. motivací a motorickou aktivitou. Změny ve výkonnosti způsobené aplikací farmak často nemohou být přímo přisuzovány ovlivnění kognice. Vyvinutí kognitivních úloh, v nichž by změny v motivaci a motorické aktivitě měly malý efekt na výsledek testu, by byly vhodné ke studiu vlivu farmak na kognici i v případech, kdy aplikace těchto látek způsobuje změny v nonkognitivním chování.

Cíl: Zjistit, zda je kognitivní výkonnost v úloze rozeznávání pozice vzdáleného objektu citlivá k farmakologickému ovlivnění motivace a motorické aktivity.

Materiál a metody: V prostorově-operantním testu rozeznávání pozice vzdáleného objektu potkani pozorují objekt zobrazený na vzdáleném LCD monitoru. Operantní odpovědi (mačkání páčky) jsou posilovány pouze, pokud je objekt zobrazen na určitém místě monitoru. Potkani ($n = 8$) byli trénováni do asymptotické úrovně výkonnosti. Poté podstoupili testové sezení, ve kterém jim byl 30 min před začátkem aplikován prazosin (3 mg/kg, i.p.). Prazosin je antagonist α_1 -adrenergních receptorů a je typickým zástupcem látek, které tlumí motorickou aktivitu a motivaci. Následující den proběhlo kontrolní sezení s aplikací fyziologického roztoku.

Výsledky: Prazosin (3 mg/kg, i.p.) způsobil pokles frekvence operantních odpovědí na 55 ± 5 % hodnoty dosažené v kontrolním sezení ($p < 0.001$), přičemž nedošlo k ovlivnění výkonnosti potkanů ($p = 0.133$).

Závěr: Podařilo se nám prokázat, že kognitivní výkonnost v úloze rozeznávání pozice vzdáleného objektu je nezávislá na změnách motivace a motorické aktivity, a to i v případech navození těchto změn pomocí aplikace antagonisty α_1 -adrenergních receptorů prazosinu. Tato úloha je tudíž vhodná ke studiu vlivu farmak na kognici i v případech, kdy aplikace těchto látek způsobuje změny v motivaci a motorické aktivitě.

Podpora projektu: Tato práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NT13386, AV ČR projektem M200111204 a Centrem Excelence GAČR P304/12/G069.

P-66. KORELACE DYNAMICKÉHO NÁRAZOVÉHO TESTOVÁNÍ, HISTOPATOLOGICKÝCH NÁLEZŮ A VIZUÁLNÍHO MAKROSKOPICKÉHO VYŠETŘENÍ U LIDSKÉ HYALINNÍ CHRUPAVKY

Kos P.¹, Varga F.², Handl M.¹, Kautzner J.¹, Chudáček V.³, Držík M.⁴, Povýšil C.⁵, Trč T.¹, Amler E.²

¹II. ortopedická klinika FN Motol; ²Ústav biofyziky 2.LF UK; ³Fakulta elektrotechnická, CVUT;

⁴International Laser Center, Bratislava; ⁵Ústav patologické anatomie 1. LF UK

Školitel: Doc. MUDr. Milan Handl, PhD.

Úvod: Pro stanovení diagnózy v časných stádiích poškození kloubní chrupavky je třeba vyvinout přesnější klasifikaci. Současné metody nedokáží přesně stanovit kvalitu chrupavky bez odebrání vzorku a histologického vyšetření.

Cíl: Cílem naší studie bylo posoudit korelaci dynamických biomechanických vlastností s histologickými nálezy a vizuálním skóre.

Materiál a metody: U 15 pacientů bylo odebráno 120 vzorků při náhradě kolenního kloubu, vždy 2 vzorky ze stejného místa – pro histologické a biomechanické testování. Vzorky byly makroskopicky klasifikovány dle International Cartilage Repair Society (ICRS). Polovina vzorků byla vyšetřena nárazovým dynamickým testováním, jako senzory byl použit Polytec Laser Doppler Vibrometer a piezoelektrický akcelerometr. Z naměřených dat byly sestaveny zátěžové diagramy a vypočteny hodnoty disipované energie nárazu, tuhosti vzorku. Druhá část vzorků, korespondujících se vzorky pro mechanické testování, byla vyšetřena patologem a oklasifikována dle histopatologické klasifikace ICRS.

Výsledky: Signifikantní rozdíly jsme prokázali u hodnot disipované energie a specifické tlumicí kapacity pro parametry 1, 2 a 3 (povrch chrupavky, extracelulární matrix, buněčná distribuce). Další charakteristiky nekorelovaly signifikantně s histologickým skóre (T-test, $p > 0.05$). Korelaci jsme našli mezi makroskopickým ICRS skóre, specifickou tlumicí kapacitou a disipovanou energií (ANOVA, $p < 0.01$). Modul pružnosti ani tuhost nekorelovaly s makroskopickou klasifikací. Naše výsledky naznačují, že tato materiálová charakteristika může sloužit pro rozlišení především časných stupňů poškození chrupavky, kdy ještě nejsou patrné výrazné makroskopické změny. Silnou závislost jsme prokázali mezi tloušťkou a energií rozptýlenou v objemové jednotce – relativní disipovanou energií ($p < 0.001$, $R^2 = 0,69$).

Závěr: Současným standardem pro klasifikaci poškození chrupavky je invazivní artroskopický odběr vzorku a jeho histologické vyšetření. U nízkého stupně makroskopické degradace (ICRS 0-1) jsou histologické nálezy velmi rozdílné. Léčba u nízkých stupňů artrózy vyžaduje časnou diagnostiku a modernější prostředky pro méně invazivní, přesnější klasifikaci. Prokázali jsme, že mechanické testování disipované energie je slibným přístupem s možným klinicky aplikovatelným dopadem, zejména při stanovení biomechanicko – histopatologické klasifikace a následné konstrukci miniinvazivních testovacích sond, nevyžadujících porušení kongruence testované tkáně.

P-67. NTH1 A STRUKTURNÍ POZADÍ JEJÍ AKTIVACE PROTEINEM BMH1

Macáková E.¹, Kopecká M.¹, Man P.², Obšilová V.¹

¹Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha; ²Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha

Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Úvod: Neutrální trehalasa 1 (Nth1) je kvasničný enzym (EC 3.2.1.28) z rodiny hydrolas, který hydrolyzuje trehalosu na dvě molekuly glukosy. Trehalosa (1- α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranosid) je zásobní metabolit, který hraje důležitou úlohu při buněčném stresu. Jak bylo dříve zjištěno, Nth1 je aktivováno kvasničnými isoformami 14-3-3 proteinů, Bmh1 a Bmh2, se kterými interaguje pomocí fosforylovaného N-konce, což bylo potvrzeno limitovanou proteolýzou. Nth1 je fosforylována pomocí PKA a vytváří s Bmh komplex v poměru 1:2. Pomocí bodové mutagenese a enzymových kinetických měření byly určeny jako fosforylační místa na N-konci serin60 a serin83. Ke studiu strukturních změn při interakci Nth1 a Bmh1 byly použity metody H/D výměna a chemické zesíťovací reakce spřažené a hmotnostní spektrometrií.

Cíl: Objasnit mechanismus aktivace Nth1 kvasničnými 14-3-3 proteiny z hlediska strukturních změn, ke kterým na proteinech dochází.

Materiál a metody: Proteiny jsou exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3) buňkách (BMH1 a BMH2 proteiny) a v Rosettách (NTH1) jako fúzní proteiny (s afinitní kotvou His-tag na N-konci). Purifikační protokoly umožňující přípravu proteinů jsou vyvinuty. Exprimované proteiny jsou purifikovány použitím afinitní chromatografie a gelové permeační filtrace, jejich čistota je monitorována užitím SDS-PAGE. Samotná měření se provádějí na MBÚ AV ČR na přístroji Bruker APEX-Q FTMS.

Výsledky: Strukturní změny Nth1 a Bmh1 při aktivaci Nth1 byly zjišťovány pomocí H/D výměny a chemických zesíťovacích reakcí spolu s hmotnostní spektrometrií. Z naměřených dat vyplývá, že v obou proteinech dochází v komplexu ke strukturním změnám. U Nth1 je ovlivněno několik oblastí, zejména v okolí aktivního centra enzymu, kde dochází nejspíše k jeho zpřístupnění, protože jinak je skryté uvnitř molekuly. Při vazbě na Nth1 je u Bmh1 ovlivněno také mnoho oblastí, a to nejen vazebný žlábek, kam se váže fosforylovaný N-konec Nth1, ale také ostatní části a povrch molekuly.

Závěr: Ačkoli stále zůstává mnoho nejasností, na které je třeba se zaměřit v budoucnu, tato měření ukázala detailní pohled na způsob aktivace Nth1 pomocí Bmh1 z hlediska strukturních změn proteinů.

Podpora projektu: Tato práce je sponzorována grantem P207/11/0455 Grantové agentury České republiky.

P-68. NEUROGENIC AND GLIOGENIC POTENTIAL OF DACH1-EXPRESSING CELLS IN THE ROOF OF THE LATERAL VENTRICLE AFTER FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA

Honsa P.^{1,2}, Pivonkova H.¹, Anderova M.^{1,2}

¹Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Experimental Medicine ASCR, v.v.i., Prague, Czech Republic; ²2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Supervisor: Ing. Miroslava Anděrová, PhD

Introduction: The mouse Dach1 gene controls the development of the neocortex and the hippocampus. It is expressed by cortical neural stem cells (NSC) at early stages of neurogenesis, and its expression also continues in certain cell subpopulations in the adult cortex and the hippocampal CA1 region. Interestingly, a subpopulation of Dach1-expressing cells is also present in the roof of the lateral ventricles (LV) and rostral migratory stream (RMS).

Aims: In this study we aimed to elucidate the role of mDach1-expressing cells in adult neurogenesis and gliogenesis under physiological as well as post-ischemic conditions.

Materials and Methods: We used a transgenic mice in which the expression of green fluorescent protein (GFP) is controlled by the D6 promoter of mouse Dach1 gene. We isolated GFP-positive (GFP+) cells from the roof of the LV and studied their ability to form neurospheres and differentiate in vitro. We also performed immunohistochemical and electrophysiological analysis of GFP+ cells in adult sham-operated brains (control) and in brains after middle cerebral artery occlusion (MCAo), which was used as a model of focal cerebral ischemia.

Results: The GFP+ cells isolated from the controls were able to form neurospheres, and after changing conditions to adherent culture, they adopted a phenotype resembling that of glial cells, i.e., they displayed time- and voltage-independent K⁺ currents and expressed nestin and GFAP. The GFP+ cells isolated from the brains after MCAo formed larger neurospheres, and subsequently, they also differentiated into cells with the current pattern and immunocytochemical properties of neuronal precursors. Immunohistochemical and electrophysiological analyses performed in control brains revealed that the GFP+ cells expressed the phenotype of adult NSC or neuroblasts. The analysis of GFP+ cells after MCAo revealed a significantly higher number of GFP+ cells expressing doublecortin, a marker of neuroblasts; nevertheless, their electrophysiological properties were comparable with those observed in controls. Following ischemic injury, more GFP+ cells migrated through the RMS into the olfactory bulb, where they differentiated into calretinin+ interneurons.

Conclusions: Taken together, our results reveal a new region in the roof of the LV where the process of adult neurogenesis takes place. In this region, Dach1-expressing cells exhibit the properties of adult NSC or neuroblasts and respond to ischemia by an increased production of neuroblasts.

Support: Supported by GA ČR: GA P303/12/0855, GAUK 383711

P-69. NEUROLOGICKÉ SLEDOVÁNÍ PACIENTU S NESPECIFICKÝMI STŘEVNÍMI ZÁNĚTY V PRŮBĚHU TERAPIE MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKOU ANTI TNF ALFA

Petra Lišková¹, Jan Šťovíček², Štěpán Hlava,² Martin Šrámek¹, Radan Keil²

¹Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol; ²Interní klinika 2. LF UK a FN Motol

Školitel: Doc. MUDr. Radan Keil, PhD

Úvod: Monoklonální protilátka proti tumor nekrotizujícímu faktoru alfa (anti-TNF alfa) je dnes důležitou součástí terapie některých autoimunitních onemocnění, včetně nespecifických střevních zánětů (IBD). Původně byla monoklonální protilátka anti-TNF alfa zvažována též v léčbě roztroušené sklerozy (MS). Dle klinických studií však anti-TNF alfa zhoršuje průběh MS. Existuje podezření, že by terapie anti-TNF alfa u pacientů s IBD mohla přispívat k rozvoji MS. Příčinou častějšího výskytu MS u pacientů s IBD však může být i prostá kumulace autoagresivních chorob u predisponovaných jedinců.

Cíl: Cílem naší prospektivní klinické studie je sledování neurologického stavu u pacientů s IBD na počátku a v průběhu terapie anti-TNF alfa

Materiál a metody: V rámci studie prospektivně sledujeme pacienty s IBD léčené anti-TNF alfa kontrolní skupinu tvoří pacienti s IBD bez této terapie. Od každého pacienta je odebrána osobní anamnéza cílená na výskyt symptomů typických pro MS. Následuje podrobné klinické neurologické vyšetření a magnetická rezonance (MRI) mozku (nativní T1, T2, FLAIR sekvence). Dle výsledků uvedených vyšetření eventuálně lumbální punkce (LP). Tento vyšetřovací program pacienti absolvují před zahájením terapie a následně po 1 roce.

Výsledky: Od 12/2007 do 2/2013 bylo dle uvedeného schématu vyšetřeno 83 pacientů (na léčbě n=48; kontrolní skupina n=35). U žádného pacienta nebyly v anamnéze zaznamenány symptomy typické pro MS. Neurologické vyšetření bylo abnormní (byť nespecificky) u 54% z celkového počtu pacientů. 80% (n=66) pacientů absolvovalo vyšetření MRI mozku, přičemž u 39% (n=26) z nich byl nález abnormní, u 7 pacientů bylo podezření na demyelinizační změny. Všichni tito pacienti podstoupili LP, u 6 z nich byl výsledek v normě, v jednom případě byla pozitivní izoelektrická fokuzace (IEF) a následně byla stanovena diagnosa MS. U tohoto pacienta byla léčba anti-TNFalfa po 2 měsících od zahájení terapie ukončena. Kontrolní klinické a MRI vyšetření po 1 roce od zahájení terapie anti-TNFalfa podstoupilo prozatím 16 pacientů. U těchto pacientů nedošlo ke změně klinického nálezu ani MRI obrazu.

Závěr: U pacientů s IBD jsme zaznamenali vysoký výskyt (39%) nespecifických abnormit na MRI mozku, a to i bez ohledu na terapii anti-TNFalfa. U jednoho pacienta s IBD byla diagnostikována MS. V rámci sledování nebyl v souladu s literárními údaji zatím zaznamenán negativní vliv léčby anti-TNFalfa na výskyt MS, pro definitivní zhodnocení je však počet zařazených pacientů nízký.

P-70. GENE SHB IS UNDEREXPRESSED IN HUMAN PROSTATE CANCER TISSUE IN COMPARISON TO BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA

Schmidt M.¹, Jarolim L.¹, Babjuk M.¹, Vesely S.¹, Mares J.²

¹Department of Urology, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; ²Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

Supervisor: doc. MUDr. Ladislav Jarolím CSc.

Introduction: Early detection of prostate cancer (pCa) is based on serum level evaluation of prostate specific antigen (PSA), digital rectal examination and ultrasound-guided prostate biopsy. Risk factors for pCa are not yet well-defined and to date no molecular markers have been used in clinical practice. SHB (Src homology 2 domain-containing adapter protein B) is involved in receptor tyrosine kinase signaling, angiogenesis, apoptosis and cell cycle regulation. Reduced tumour growth in vivo and increased c-Abl activity in PC3 prostate cancer cells overexpressing SHB has been described in mice.

Aims: To compare the SHB expression in pCa and benign prostatic hyperplasia (BPH) with clinicopathological data and to evaluate its diagnostic and prognostic potential.

Materials and Methods: The study comprised 56 patients with histologically confirmed PCa including 39 classified as T2 and 17 evaluated as T3 and T4. As a control group, 26 patients with benign prostate hyperplasia were used. Material has been obtained perioperatively in surgical procedures or with transrectal ultrasound guided biopsy. Tumor tissues were clinically and microscopically classified according to the TNM classification and Gleason score. RNA was isolated by Qiagen Midi mRNA kit. RT-PCR was performed by Qiagen One Step RT-PCR kit according to the manufacturer's recommendations. We used expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an endogenous control gene for calculation of the relative expression. The data were analyzed by Mann-Whitney test. P less or equal 0.05 was considered statistically significant. Cut off values were calculated by partition platform of the software.

Results: Relative gene expression of the SHB was significantly higher in BPH samples ($\mu=0.647\pm0.237$; $p<0.001$) than in tumor samples ($\mu=0.345\pm0.198$). In comparison of pCa groups divided by Gleason score (GS <7 and GS \geq 7), age and PSA, no differences have been detected. In this study an evidence is provided for SHB downregulation in prostate cancer performed by RT-PCR.

Conclusions: SHB is a pleiotropic adaptor protein taking part in migration, proliferation, differentiation and apoptosis. SHB is significantly underexpressed in pCa tissue comparing to BPH. In comparison of localized (T2) and locally advanced (T3-T4) tumours, underexpression of SHB in locally advanced disease was detected. SHB is a potential prognostic and diagnostic biomarker of prostate cancer.

Support: Research was supported by GAUK 200090

P-71. VLIV TELMISARTANU A HYPERINZULINÉMIE NA EXPRESI GENŮ U PACIENTŮ S PORUCHOU GLUKÓZOVÉ TOLERANCE

Klementová M.¹, Wohl P.¹, Krušinová E.¹, Kratochvílová S.¹, Kopecký J.¹, Halbhuber Y.², Blatný R.², Pelikánová T.¹

¹Centrum diabetologie, Institut klinické a experimentální medicíny Praha; ²Central European Biosystems Praha

Školitel: Prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Úvod: Několik dřívějších studií popsalo preventivní účinek běžného antihypertenziva telmisartanu proti rozvoji diabetu mellitu. Mechanismus, kterým zlepšuje glukózový a lipidový metabolismu cestou blokády angiotenzinových receptorů, však není u lidí dosud zcela vysvětlen.

Cíl: Naším cílem bylo nalézt geny, jejichž exprese bude ovlivněna podáváním telmisartanu a zároveň zohlednit roli hyperinzulinémie.

Materiál a metody: 12 pacientů s poruchou glukózové tolerance dokončilo dvojitě zaslepenou, randomizovanou cross-over studii. Pacienti užívali 3 týdny 160 mg/d telmisartanu (T) nebo placebo (P) a poté naopak s 2 týdenní wash-out periodou. Na konci každé periody byl proveden hyperinzulinový euglykemický clamp. V čase 0 a 30 min byly izolovány mononukleární buňky ze žilní krve, ze kterých byla získána RNA. Poté byl stanoven celogenomový profil metodou expresní microarraye. Funkční vztahy ovlivněných genů byly hodnoceny programem MetaCore.

Výsledky: Významný rozdíl v expresi genů byl nalezen mezi T 0 min (od počátku clampu) a P v čase 0 min (1248 genů, $p < 0,05$) a mezi T 30min a P 30min (1254 genů, $p < 0,05$). Většina genů se změnou exprese hraje důležitou roli v signalizaci IFN alfa a beta, IL-1, IL-5, IL-6, IL-13 a IL-17 a účastní se imunitní odpovědi. Nalezeny byly také rozdíly v expresi genů, které jsou součástí signalizace GnRH, regulace zánětlivé odpovědi glukokortikoidy a regulace buněčného metabolismu transkripčním faktorem AP-1. Rozdíly v expresi genů mezi P0 a P30 (34 genů, $p < 0,1$) a T0 a T30 (25 genů, $p < 0,1$) nebyly statisticky významné.

Závěr: Naše výsledky prokazují, že telmisartan mění aktivaci genů a signálních drah účastnících se prozánětlivých procesů, imunitní reaktivity a pravděpodobně i hormonálního řízení buněčných procesů. Tyto procesy se bezprostředně týkají patofyziologických mechanismů rozvoje diabetu a metabolického syndromu. Exprese genů nebyla ovlivněna krátkodobou hyperinzulinémií.

Podpora projektu: Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) rozvoje výzkumné organizace 00023001 (IKEM) – Institucionální podpora

P-72. TRANSKRANIÁLNÍ DOPPLEROVSKÁ MONITORACE MIKROEMBOLIZAČNÍCH SIGNÁLŮ PŘI KAROTICKÉM STENTINGU S VYUŽITÍM PROXIMÁLNÍ PROTEKCE

Špaček M., Veselka J.

Kardiologická klinika UK 2.LF a FN Motol Praha

Školitel: Prof. MUDr. Josef Veselka, CSc.

Úvod: Karotický stenting (CAS) představuje u selektovaných pacientů metodu první volby v léčbě významné karotické stenózy. Bezpečnost metody závisí na riziku periprocedurálních komplikací, a je zvýšena použitím protektivních systémů. Je známo, že mnohočetné sprchy mikroembolizačních signálů (MES) detekované pomocí transkraniální Dopplerovské monitorace (TCD) v průběhu CAS s využitím distální protekce ("filtrů") jsou asociovány s vyšším rizikem periprocedurálních komplikací. Použití proximálních protektivních systémů by mělo být bezpečnější a účinnější v redukci celkového množství MES. Tyto systémy spočívají v přerušení toku v a. carotis interna (pomocí balonkové okluze - "clampu" - a. carotis externa a a. carotis communis) a následném odsátí aterosklerotických hmot před obnovením toku po implantaci stentu. Dosud nebyla publikována data popisující výskyt sprch MES v průběhu CAS s využitím proximálních protektivních systémů.

Cíl: Cílem této pilotní studie bylo sledovat rozložení výskytu MES (a zejména sprch MES) v průběhu CAS s využitím proximálního protektivního systému (MO.MA).

Materiál a metody: V období od dubna 2012 do prosince 2012 byl na našem pracovišti proveden CAS s využitím proximálního protektivního systému u 12 pacientů. Celkem u 5 pacientů bylo možné provést kompletní TCD monitoraci v průběhu výkonu.

Výsledky: U 1 pacienta byly v době clampu detekovány opakovaně solitární MES. Angiograficky byla zjištěna malpozice distálního balónu. Po repozici nebyly následně MES detekovány. U ostatních 4 pacientů nebyly v období clampu MES detekovány. Po uvolnění clampu byly detekovány sprchy MES u všech pacientů v celkovém počtu 3, 1, 4, 5 a 4.

Závěr: Z dosažených výsledků vyplývá, že využití proximálního protektivního systému by mohlo být efektivní v redukci MES v období clampu. Uvolnění clampu je však doprovázeno detekcí sprch MES. Optimalizace metody CAS se zaměřením na redukci MES po uvolnění clampu by mohla vést ke zvýšení bezpečnosti metody.

P-73. KOŽNÍ NÁDORY U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI SRDCE. PILOTNÍ STUDIE V SOUBORU 467 PACIENTŮ.

Sečnicková Z.^{1,2}, Džambová M.^{1,2}, Göpfertová D.², Šmerhovský Z.², Hercogová J.¹

¹Dermatovenerologická klinika 2. LF UK a Nemocnice Na Bulovce, Praha; ²Ústav epidemiologie 2. LF UK, Praha

Školitel: Doc. MUDr. Dana Göpfertová, CSc.

Úvod: Transplantace srdce zvyšuje dlouhodobé přežití pacientů v terminálním stadiu srdečního selhání. I přes významný přínos pro pacienta přináší potransplantační období s imunosupresivní terapií množství komplikací, zejména vyšší riziko vzniku malignity. Nejčastějším typem novotvarů u pacientů po transplantaci jsou kožní nádory, zejména nemelanomové kožní nádory (NMSC).

Cíl: Naším záměrem je zjistit prevalenci kožních nádorů u pacientů po transplantaci srdce a specifikovat roli dalších faktorů podílejících se na výskytu nádorů kůže. Cílem je poskytnout dostatečné údaje pro vytvoření standardního postupu sekundární prevence kožních novotvarů v rámci potransplantační dispenzarizace v České republice.

Materiál a metody: Retrospektivní kohortová studie byla provedena na 467 žijících pacientech (369 mužů a 98 žen, ve věku 18-82 let), kteří podstoupili transplantaci srdce v letech 1984-2011 v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Zahřnuty byly pouze nádory s histopatologickou verifikací. Incidence byla stratifikována s cílem posoudit rozdíly podle věku a pohlaví. Získané výsledky byly porovnány s externí kontrolní skupinou zastoupenou běžnou českou populací a platnými epidemiologickými údaji z Národního onkologického registru. Vztah mezi expozicí a incidencí kožních malignit byl popsán pomocí standardizované úmrtnosti (SMR) vypočtené nepřímou standardizací zahrnující věk, pohlaví a kalendářní období.

Výsledky: Ve sledované skupině bylo zjištěno nádorové onemocnění kůže u 34 pacientů (30 mužů a 4 žen). Celkem bylo detekovaných 83 kožních nádorů, kde nejčastějším typem nádoru byl spinocelulární karcinom (n=42, 50%), následovaný bazocelulárním karcinomem (n =26, 30,9%). U jednoho pacienta jsme zaznamenali maligní melanom a morbus Bowen byl zjištěn u 7 pacientů po transplantaci. Nejčastější lokalizace kožního nádoru byla oblast hlavy a krku u 83% úpacientů. Vícečetné kožní nádory byly nalezeny u 15 pacientů, 12 pacientů vyvinulo víc než 2 kožní malignity. V kohortě našich pacientů je odhadované relativní riziko (RR) pro vztah imunosuprese a výskytu kožních nádorů 102,16, které předběžně potvrzuje silný vztah mezi imunosupresivní léčbou a výskytem kožních nádorů.

Závěr: Prezentované výsledky nejsou definitivní vzhledem k tomu, že studie v současné době probíhá a sběr dat není ukončen. Dosavadní data ale poukazují na silný vztah mezi imunosupresivní léčbou a výskytem kožních nádorů. Dosud nebyla studie zabývající se problematikou kožních nádorů po transplantaci srdce v České republice provedena.

P-74. EVALUATION OF ELASTIN IN HUMAN ATRIAL WALL IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION USING IMMUNOHISTOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES

Bláha M.^{1,2}, Melenovský V.¹, Lantová L.³, Smorodinova N.³, Kučera T.³, Kautzner J.¹

¹Department of Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine; ²Institute of Pathophysiology, Charles University Medical School II; ³Institute of Histology and Embryology, Charles University Medical School I, Prague, Czech Republic

Školitel: prof. MUDr. Josef Kautzner, CSc., FESC

Úvod: Objective: Atrial fibrillation (AF) is one of the most common arrhythmias in human with prevalence reaching 1-2 %. Both experimental and clinical data suggest that AF leads to electrical, contractile and structural remodeling. Structural remodeling that results predominantly in atrial fibrosis is believed to be associated with maintenance of AF and its progressive character. Apart from collagen involved in atrial fibrosis, there are a number of other extracellular molecules.

Cíl: Aim: The aim of this study was to evaluate elastin in atrial tissue of patients with AF.

Materiál a metody: Methods: Myocardial elastin expression was studied in the left atrial (LA) and right atrial (RA) biopsies, sampled from patients with persistent AF (18 patients) or in sinus rhythm (SR, 29 patients) during coronary bypass or mitral valve surgery. The expression of elastin gene, using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and counting relative quantification (RQ) of elastin mRNA, was analyzed in both groups. Parallel tissue samples were used for immunohistological staining. Morphometric evaluation using image analysis software compared elastin fibre fraction in the measured myocardial volume (EVF) between AF and SR samples.

Výsledky: Results: Morphometric analysis showed significantly higher elastin fraction in the RA myocardium as compared to the LA samples, independently of the presence or absence of AF (EVF 10.59% vs 3.54%, $p < 0.0001$). However, analysis of elastin expression did not show any significant difference between the RA and LA tissue (RQ 45.25 vs 72.52, $p = 0.44$). Neither morphometric analysis, nor RT-PCR showed any significant difference in atrial myocardial elastin fraction or elastin expression between patients with AF and SR. This was true both for the RA (EVF 11.27% in SR, 9.44% in AF, $p = 0.34$; RQ 70.21 in SR, 10.90 in AF, $p = 0.22$) and for the LA (EVF 3.99% in SR, 2.94% in AF, $p = 0.17$; RQ 47.14 in SR, 130.55 in AF, $p = 0.09$).

Závěr: Conclusions: Significantly higher elastin content in the RA tissue as compared with the LA samples does not reflect the presence or absence of AF. The absence of differences in elastin content or expression of elastin gene in atrial tissue between patients with AF and SR suggests that elastin does not play important role in atrial remodeling due to AF.

P-75. SÉROVÝ 3-NITROTYROSIN JAKO ČASNÝ MARKER NOVOROZENECKÉ SEPSE

Kezňniklová P.¹, Vízek M.², Franěk T.³, Štádler V.³

¹Novorozenecké oddělení FN Motol, Praha; ²Ústav patologické fyziologie 2.lf UK, Praha; ³Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2.lf UK, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Martin Vízek CSc.

Úvod: Časná novorozenecká seps je jednou ze závažných příčin novorozenecké mortality a morbidity. Zásadní vliv má její včasná diagnostika, která se opírá o klinické i laboratorní zhodnocení stavu novorozence i stavu matky za porodu. V současné době využívané laboratorní ukazatele zánětu byly opakovaně zkoumány stran specifity i senzitivity při diagnostice novorozenecké seps - často s kontroverzními výsledky.

Novou metodou v diagnostice novorozenecké seps by mohlo být stanovení 3-nitrotyrosinu v krevním séru. Tento produkt nitrace bílkovinné aminokyseliny tyrosinu je ve zvýšené míře detekovatelný ve tkáni či tělesných tekutinách člověka krátce po začátku systemové zánětlivé reakce organismu. K nitraci dochází prostřednictvím reaktivních sloučenin dusíku vznikajících z oxidu dusného.

Cíl: Naším cílem bude stanovit, zda je elevace sérového 3-nitrotyrosinu u novorozenců s časnou novorozeneckou sepsí signifikantní oproti zdravým kontrolám.

Materiál a metody: Využíváme pupečnickovou krev odebranou po porodu novorozence a rezidua krevního séra z postnatálně odebraných vzorků novorozence. K vyloučení maternálního podílu analyzujeme též mateřskou žilní krev.

Odběry materiálu probíhají u přesně stanovené skupiny rodiček a novorozenců, vodítkem jsou příznaky a stavy rizikové pro vznik zánětu plodových obalů a následné časně novorozenecké seps. Rozvoj časně novorozenecké seps je hodnocen jako nástup klinických symptomů do 72 hodin po porodu s mikrobiologicky prokázanou septikémií. Nástup klinických symptomů bez septikémie avšak s elevací laboratorních markerů infekce hodnotíme jako "pravděpodobnou sepsí".

Analýza vzorků probíhá pomocí kvantitativního stanovení 3-nitrotyrosinu metodou kompetitivní ELISA, vzorky vyšetřujeme retrospektivně u skupiny s prokázanou/pravděpodobnou časnou novorozeneckou sepsí a dále u kontrolní skupiny.

Výsledky: Byla odebrána a analyzována zkušební sada vzorků k otestování postupů. Začátkem roku 2013 bylo zahájeno odebírání vzorků ve spolupráci s pracovištěm Gynekologicko-porodnické kliniky a Novorozeneckým oddělením FN Motol.

Závěr: Práce navazuje na výzkumné projekty Ústavu patologické fyziologie 2. lf UK a Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. lf UK. Závěry výzkumného projektu mohou být přínosem nejen k dalšímu výzkumu 3-nitrotyrosinu, ale prospektivně i k rozšíření poznání v oblasti laboratorní diagnostiky infekcí u novorozence.

Podpora projektu: Podána žádost o grant GAUK pro rok 2013

P-76. KVANTIFIKACE FUNKCE SYSTÉMOVÉ PRAVÉ KOMORY POMOCÍ MRI A ECHOKARDIOGRAFIE U PACIENTŮ S TRANSPOZICÍ VELKÝCH TEPEŇ PO TRANSATRIÁLNÍ KOREKCI

Adla T.¹, Krupičková S.², Suchánek V.¹, Antonová P.³, Popelová J.⁴, Tomek V.², Chaloupecký V.², Škovránek J.², Janoušek J.², Roček M.¹

¹Klinika zobrazovacích metod, 2. LF UK a FN Motol, Praha; ²Dětské kardiocentrum, FN Motol, Praha; ³Kardiologické oddělení FN Motol, Praha; ⁴Kardiologické oddělení, Nemocnice na Homolce, Praha

Školitel: doc. MUDr. Miloslav Roček, CSc.

Úvod: U pacientů s transpozicí velkých tepen po transatriální korekci (svedením dutých žil k levé síni a plicních žil k pravé síni) je ponechána aorta odstupující z pravé komory a plicnice z anatomicky levé komory. Pravá komora (PK) tedy pracuje proti odporu vysokotlakého systémového řečiště. To vede k hypertrofii trabekul. Kvantifikace funkce PK je tak obtížná nejen díky matematicky hůře definovatelnému tvaru PK, ale také díky hypertrofickým trabekulám uvnitř lumen.

Cíl: Cílem práce bylo porovnat jednotlivé echokardiografické parametry vyjadřující funkci PK s ejekční frakcí změnou pomocí volumetrie magnetickou rezonancí.

Materiál a metody: Z plánovaných 150-ti pacientů byly zatím kompletní výsledky získány u 18-ti pacientů (16 mužů, průměrný věk 21 +/- 3 roky). Echokardiografické parametry pro hodnocení funkce PK byly použity procentní frakce zkrácení z diametru v nejširším místě PK (FS), zmenšení plochy PK ve čtyřdutinové projekci (FAC - fraction area change) a systolického pohybu trikuspidálního anulu směrem k hrotu (TAPSE - tricuspid annular plane systolic excursion). Z vyšetření magnetickou rezonancí (MR) byly získány po sobě jdoucí pohyblivé obrazy přes celou PK v krátké ose a transverzálně. Dedikovaným softwarem byly změřeny objemy pravé komory a vypočítána ejekční frakce z obrazů v krátké ose (EF-SA) a z transverzálních (EF-TRA). Statisticky byla jednotlivá měření porovnána pomocí korelačního koeficientu se stanovením statické významnosti pomocí konfidenčních intervalů a hodnoty p.

Výsledky: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky pro jednotlivá měření jsou tato: FS 0,20 +/- 0,06, FAC 0,29 +/- 0,08, TAPSE 14,7 +/- 3,1 mm, EF-SA 0,56 +/- 0,09 a EF-TRA 0,53 +/- 0,07. Korelační koeficient mezi měřeními EF pomocí MR z transverzálních obrazů a obrazů v krátké ose byl 0,65 (95%CI 0,27-0,86, p=0,003). U porovnávaných ECHO parametrů byla nalezena statisticky významná korelace s měřením pomocí MR především u FAC, kdy u porovnání s EF-SA byl R = 0,51 (95%CI 0,05-0,79, p=0,032) a u EF-TRA dokonce R = 0,61 (95%CI 0,20-0,84, p=0,007). U FS byla statisticky významná shoda pouze s MR-TRA, kde R=0,49 (95%CI 0,04-0,78, p=0,037).

Závěr: Předběžné výsledky ukazují, že echokardiografické vyšetření se málo shoduje s výsledky MR, která bývá považována za nejspolehlivější metodu pro měření srdečních objemů. V dostupné literatuře se obdobná srovnání prezentují na skupinách 20-30 pacientů, proto jedním z budoucích přínosů práce bude porovnání všech plánovaných 150 pacientů.

Podpora projektu: Financováno z grantu IGA MZČR NT 1340

P-77. HOW CALCIUM AND BMH1 ACTIVATE YEAST NEUTRAL TREHALASE NTH1?

Kopecka M.¹, Rezabkova L.¹, Macakova E.¹, Man P.² and Obsilova V.¹

¹Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Praha; ²Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Praha

Supervisor: RNDr. Veronika Obsilova, Ph.D.

Introduction: Yeast neutral trehalase (Nth1, EC 3.2.1.28) is a highly conserved enzyme which was found in many organisms. Nth1 from the *Saccharomyces cerevisiae* hydrolyses the cytosolic disaccharide trehalose into two molecules of glucose. Trehalose serves as a carbon and energy source as well as a universal stress protectant against adverse conditions like dehydration, heat or oxidation. The activity of Nth1 is regulated by PKA protein phosphorylation, yeast 14-3-3 (Bmh) protein binding and by Ca²⁺.

Aims: The aim of our study is to reveal how the Ca²⁺ and Bmh1-binding affect the activity of Nth1. The Ca²⁺ dependent activation of Nth1 is connected with specific EF-like motif D114TDKNYQITIED125 which is located in the N-terminus of Nth1. This motif is conserved in many Ca⁺ binding proteins. Residues D114 and D125 are probably responsible for Ca²⁺ binding and I121 is important for a correct conformation of the motif. Therefore we prepared four Nth1 mutants with one-point mutation in this motif.

Materials and Methods: The Nth1 protein was expressed as a thioredoxin and six-His-tag fusion protein and purified from *Escherichia coli* Rosetta (DE3) cells using the Chelating Sepharose Fast Flow. For our study we used native TBE/PAGE, analytical ultracentrifugation, circular dichroism (CD), enzyme-kinetic measurements and hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS).

Results: Our kinetic measurements revealed that Nth1 mutants D114 and D125 are not activated by Bmh1 or Ca²⁺, although they form complexes on SV and native TBE/PAGE. CD detected no significant changes in the secondary structure upon the mutation. Sedimentation velocity measurement was used to check the oligomeric status of the Nth1 mutants. From the HDX-MS measurements we suggest that regions surrounding the buried active site of pNth1 directly interact with Bmh1. These regions undergo a structural change and thus enable easier substrate and products entry and departure. The Ca²⁺ dependent structural changes of Nth1 revealed that region containing putative Ca²⁺ binding site and segments from the vicinity undergo a significant structural change in the presence of Ca²⁺.

Conclusions: From our results we conclude the mechanistic explanation of the crucial regulatory mechanism in yeast Nth1. Ca²⁺ and Bmh1-binding affect the structure of several Nth1 regions including those surrounding the active site, though activating the enzyme which starts to metabolize trehalose to glucose.

Support: Supported by the Grant P207/11/0455 of the Grant Agency of the Czech Republic.

P-78. THE FUNCTIONAL EXPRESSION OF TRPV4 CHANNELS IS SIGNIFICANTLY INCREASED IN REACTIVE HIPPOCAMPAL ASTROCYTES SEVEN DAYS AFTER CEREBRAL HYPOXIA/ISCHEMIA

Butenko O., Dzamba D., Benesova J., Honsa P., Anderova M.

Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Školitel: Ing. Miroslava Anděrová, CSc

Úvod: During ischemia/reperfusion, rapid Ca²⁺ entry in astrocytes can occur via the activation of voltage-gated Ca²⁺ channels, NMDA and P2X7 receptors, Na/Ca²⁺ exchangers or transient receptor potential (TRP) channels. Recently, the expression of the TRPV4 channel, a member of the vanilloid subfamily, was demonstrated in cultured astrocytes and adult rat cortical astrocytes (Benfenati et al., 2007). However, the role of TRPV4 channels in astrocyte pathophysiology was not elucidated yet.

Cíl: We studied the functional expression of astrocytic TRPV4 channels in the adult rat hippocampal CA1 region after cerebral hypoxia/ischemia (H/I) induced by bilateral carotid occlusion combined with hypoxic conditions and followed by reperfusion.

Materiál a metody: We have compared TRPV4 channel expression in astrocytes of sham-operated rats (controls) and those 1 hour (1H) or 7 days (7D) after H/I employing immunocyto/histochemical analyses, the patch-clamp technique and intracellular Ca²⁺ imaging on adult hippocampal astrocytes in situ and in vitro.

Výsledky: Immunocyto/histochemical analyses revealed the increased expression of TRPV4 channels in astrocytes 1H and 7D after H/I when compared to controls, coinciding with the developing astrogliosis. Patch-clamp recordings in vitro showed a typical TRPV4 current activated by specific agonist 4αPDD in astrocytes isolated from controls and after H/I; however, a significantly increased TRPV4 current amplitude/density was detected only in astrocytes 7D after H/I. 4αPDD-induced currents were abolished by the removal of extracellular Ca²⁺ or the application of RN1734 or Ruthenium Red. Ca²⁺ imaging measurements in vitro confirmed enhanced TRPV4-specific Ca²⁺ entry in astrocytes isolated from animals 7D after H/I. Moreover, an increasing incidence of 4αPDD-induced Ca²⁺ entry was revealed in astrocytes isolated from the ischemic hippocampus. Similarly, in astrocytes in situ, 4αPDD application significantly increased the transient calcium spike rate and TRPV4 current amplitude in astrocytes 7D after H/I.

Závěr: Collectively, our data show that TRPV4 cation channels are involved in ischemia-induced Ca²⁺ entry in reactive astrocytes and might be involved in the pathogenic mechanisms of astroglial reactivity following ischemic insult.

Podpora projektu: Supported by GACR P303/10/1338, GACR309/08/H079

POZNÁMKY

POZNÁMKY