Univerzita Komenského
Lekárska fakulta v Bratislave

Vedecká konferencia
študentov lekárskych fakúlt
Českej a Slovenskej republiky

Zborník prác

Bratislava
9.-10. november 2009

Editor: Pavol Janega
Recenzenti: doc. MUDr. D. Ostatníková, PhD., doc. MUDr. B. Mladosievičová, CSc.

Za obsahovú a jazykovú správnosť príspevkov zodpovedajú autori.

Tlač Tribun EU s.r.o., Gorkého 41, 602 00 Brno
© Univerzita Komenského v Bratislave

ISBN 978-80-223-2744-2

2009

Vedecká konferencia študentov lekárskych fakúlt
Českej a Slovenskej republiky

sa koná pod záštitou

prof. MUDr. Petra Labaša, CSc.
dekana LF UK

pri príležitosti 90.výročia
založenia Lekárskej fakulty
Univerzity Komenského
v Bratislave

Sponzori vedeckej konferencie študentov lekárskych fakúlt Českej a Slovenskej republiky

Hlavný partner

GEDEON RICHTER LTD.

Partneri

Občianske združenie PROBIOLMED

Vážené kolegyne, vážení kolegovia, milé študentky, milí študenti,

vítame Vás čo najsrdečnejšie na Vedeckej konferencii študentov lekárskych fakúlt Českej a Slovenskej republiky na pôde Lekárskej fakulty v Bratislave. Naša fakulta práve v týchto dňoch oslavuje 90. výročie príchodu prvých „poslov medicíny“ - profesora K. Hynka a jeho kolegov, ktorí začali budovať lekársku fakultu. Stretnutie s kolegami z Českej republiky považujeme preto za symbolické. Pripravovaná konferencia predstavuje živý dôkaz vzájomnej prepojenosti a rozvíjajúcej sa spolupráce v rámci českej aj slovenskej medicíny a vedy.

Toto stretnutie považujeme za dôležité z viacerých dôvodov:

Umožňuje nám vzájomne sa podporovať v odhodlaní robiť poctivú, kvalitnú vedu, v presvedčení, že bez expozície vedou si medicína nevystačí.

Stretnutie so špičkovými študentami a pedagógmi môže byť pre viacerých z nás motiváciou a inšpiráciou pre nové snaženia, pre spoluprácu.

Interdisciplinárny charakter študentských konferencií nás zakaždým obohacuje o poznatky z iných medicínskych odborov a vedných disciplín. Súťažiacich učí vysvetliť zložité problémy jednoduchým spôsobom, čo môže byť neraz väčšie umenie ako na podujatiach špecialistov, ktorí problematike rozumejú.

Verím, že osobný prejav, originálne komunikačné schopnosti každého z prezentujúcich a diskutujúcich, premyslené dielo každej prednášky a nové poznanie urobia naše stretnutie zaujímavé a nezabudnuteľné.

Želám Vám veľa úspechov a osobnú spokojnosť.

Doc. MUDr. Beata Mladosievičová, CSc.

prodekanka LF UK v Bratislave

Miesto konania konferencie: Malá a Veľká posluchárеň Nových teoretických ústavov LF UK, Sasinkova 4, Bratislava

Časový limit prednášok – 10 minút, diskusie – 10 minút

Práce môžu byť prezentované v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku

Program konferencie

8.30 *Otvorenie konferencie – dekan LF UK (Veľká poslucháreň NTÚ)*

8.35- 8.55 *Vyžiadaná prednáška*

prof. MVDr. Michal Novák, DrSc.
Neuroimunologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Program predklinickej a teoretickej sekcie

9.00 - 10.40 *Odborné prednášky (Veľká poslucháreň NTÚ)*

1. Linopirdine primes hypoxic pulmonary vasoconstriction in saline perfused rat lungs
Youssef Ghaly, Tarik Adam
Supervisor: prof. MUDr. Jan Herget, DrSc.
Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

2. Proteomic changes of malignant cells induced by short-term treatment with valproic acid
Markéta Kostrouchová
Supervisor: prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.
Charles University, 3rd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

3. Vliv vápníkového senzitizátoru levosimendanu na kontraktilitu srdečních preparátů morčete
Tomáš Kazda
Školiteľ: prof. MUDr. Marie Nováková, PhD.
Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno, Česká republika

4. Reakce kmenových buněk zubní pulpy a periodoncia na ozáření 60Co
Benjamín Víšek
Školiteľ: MUDr. Tomáš Soukup
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta, Hradec Králové, Česká republika

5. Different ischemic preconditioning regimens affecting preservation injury of intestines
Ján Varga, Martin Bujdoš
Supervisors: prof. MVDr. Mikuláš Pomfy, CSc., MVDr. Štefan Tóth, PhD., Mihai Oltean, M.D.
P. J. Šafárik University, Faculty of Medicine, Košice, Slovak republic

10.40 – 11.00 *Prestávka*

11.00 - 13.00 Odborné prednášky (Veľká poslucháreň NTÚ)

6. Antiapoptotic protein survivin and its expression in malignant melanoma
Anna Antošíková
Supervisor: doc. MUDr. Marian Adamkov, CSc.
Comenius University, Jessenius Faculty of Medicine, Martin, Slovak republic

7. Exprese genu RECK v plicní tkáni pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem
Lukáš Řehoř
Školitelia: MUDr. Vlastimil Kulda, RNDr. Martin Pešta, PhD.
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta, Plzeň, Česká republika

8. Možnosti fenotypových metod v detekci širokospektrých beta-laktamáz v mikrobiologické praxi
Miroslava Htoutou Sedláková
Školiteľ: prof. MUDr. Milan Kolář, PhD.
Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Olomouc, Česká republika

9. Omega-3 nenasýtené mastné kyseliny a Atorvastatín ovplyvňujú medzibunkovú komunikáciu v myokarde a v aorte hypertriacylglycerolemických potkanov
Lucia Kolenová
Školitelia: RNDr. Katarína Dlugošová, RNDr. Narcis Tribulová, DrSc.
Univerzita Komenského, Lekárska fakulta, Bratislava, Slovenská republika

10. Testování inhibičního potenciálu reaktivátorů acetylcholinesterasy in vitro
Vendula Šepsová
Školiteľ: PharmDr. Jana Žďárová Karasová
Univerzita Obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové, Česká republika

11. Vliv narušené zubní estetiky na vnímání atraktivity úsměvu mezi zubními lékaři, ortodontisty a laiky
Veronika Cahová
Školiteľ: doc. MUDr. Miloš Špidlen PhD.
Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Olomouc, Česká republika

Program klinickej sekcie

9.00 - 10.40 Odborné prednášky (Malá poslucháreň NTÚ)

12. Pericentrická inverze chromozomu 9 – pouhá varianta?
Antonín Šípek
Školitelia: MUDr. Aleš Panczak, CSc., MUDr. Romana Mihalová
Univerzita Karlova, 1. Lékařská fakulta, Praha, Česká republika

13. Rozvoj funkce transplantované ledviny u dětí ve vztahu k poměru hmotnosti dárce/příjemce (donor/recipient body masses ratio - D/R BMR)

Eva Foltynová
Školitel': MUDr. Jaroslav Špatenka, CSc.
Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, Praha, Česká republika

14. Hypoglykémie na jednotce intenzivní metabolické péče FNKV: Výskyt, příčiny, léčení, výsledky u 100 pacientů

Josef Fontana
Školitel': prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.
Univerzita Karlova, 3. Lékařská fakulta, Praha, Česká republika

15. Mortalita nemocných s chronickým srdečním selháním sledovaných ve specializované ambulanci

Lujza Galková
Školitelia: MUDr.Ondřej Ludka, PhD., prof. MUDr. Jindřich Špinar, CSc.
Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno, Česká republika

16. Příspěvek k patogenezi kalcifikované aortální stenózy – vaskularizace chlopní

Lukáš Krbal
Školitel': prof. MUDr. Ivo Šteiner, CSc.
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta, Hradec Králové, Česká republika

10.40 – 11.00 Prestávka

11.00 - 13.00 Odborné prednášky (Malá poslucháreň NTÚ)

17. Polymorfizmus biotransformačných génov glutatión S-transferázy a riziko vzniku karcinómu pľúc

Martina Mišániková
Školitelia: MUDr. Anton Dzian , RNDr. Tatiana Matáková
Univerzita Komenského, Jesseniova lekárska fakulta, Martin, Slovenská republika

18. Inhibition of transforming growth factor beta-1 augments liver regeneration after partial portal vein ligation in porcine experimental model

Jan Brůha
Supervisors: MUDr. Václav Liška PhD., prof. MUDr. Vladislav Třeška, PhD.
Charles University, Faculty of Medicine, Pilsen, Czech Republic

19. Dominance of topical negative pressure in the treatment deep sternal wound infection in cardiothoracic surgery

Patrick Tobbia
Supervisor: MUDr. Martin Šimek PhD.
Palacký University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic

20. Gilbertov syndróm - vplyv benígnej hyperbilirubinémie na markery oxidačného stresu a na lipidový profil

Tomáš Sýkora
Školitelia: RNDr. Zuzana Paduchová, PhD., MUDr. Ivan Očadlík
Univerzita Komenského, Lekárska fakulta, Bratislava, Slovenská republika

21. Hodnocení úrovně znalostí první pomoci u studentů gymnázií

Luděk Hána, Tomáš Veleta
Školiteľ: MUDr. Radovan Matoušek, PhD.
Univerzita Obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové, Česká republika

22. Permeabilita dentinu a její klinický význam

Michal Beneš
Školitelia: MUDr. H. Hecová, MUDr. J. Stehlíková
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta, Plzeň, Česká republika

13.00 – 14.00 *Obed*

14.00 – 15.00 *Prezentácia sponzorov, vyhlásenie výsledkov a ukončenie konferencie*

Predklinická a teoretická sekcia

Odborná komisia

Predseda

prof. MUDr. Vladimír Bencko, DrSc.	Univerzita Karlova, 1.LF, Praha, ČR

Členovia

doc. MUDr. Kateřina Kaňková, PhD.	Masarykova univerzita, LF, Brno, ČR
doc. MUDr. Romana Šlamberová, PhD.	Univerzita Karlova, 3.LF, Praha, ČR
doc. MUDr. Rostislav Večeřa, PhD.	Palackého univerzita, LF, Olomouc, ČR
MUDr. Mgr. Ing. Peter Celec, PhD. MPH	Univerzita Komenského, LF, Bratislava, SR

Linopirdine Primes Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in Saline Perfused Rat Lungs

Youssef Ghaly, Tarik Adam

Co-author: Vojtech Sedivy
Supervisor: prof. MUDr. Jan Herget, DrSc.
Centre for Cardiovascular Research and Department of Physiology, Charles University-Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

Introduction

The key underlying mechanisms resulting in pulmonary vasoconstriction during hypoxia, in blood perfused lungs, an important and known physiologic attribute of pulmonary smooth muscle cells (PASMC), are not specifically known. In order to investigate hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) in saline perfused isolated rat lungs, different vasoactive substances are required to induce responses to ventilatory hypoxia (1). A subgroup of voltage gated potassium channels known as KCNQ, are important in setting resting membrane potential and reactivity of pulmonary vessels (2).

Ventilation-perfusion matching in the lung optimises HPV, diverting blood flow to well ventilated areas of the lung. HPV leads to detrimental increase in pulmonary artery (PA) pressure, consequently under conditions of global hypoxia leading to pulmonary hypertension (PH). Sustained PH develops in chronic hypoxic lung disease (chronic obstructive lung disease, sleep disordered breathing, alveolar hypoventilation disorders, and chronic exposure to high altitude) by dysfunction of mechanisms regulating pulmonary.

Members of the KCNQ channels have been widely studied, demonstrating that they have important physiological functions (3). KCNQ genes encode a family of voltage-gated potassium channels with six membrane spanning domains. PASMCs were found to express KCNQ4 mRNA at high levels than systemic vessels, making an important contribution to the regulation of pulmonary vascular tone (2).

The experiment examined the effects of linopirdine; a selective KCNQ potassium channel blocker; on hypoxic pulmonary vasoconstriction in physiological salt solution (PSS) perfused rat lungs.

Methods

The effects of linopirdine were investigated on preparations of isolated saline-perfused rat lungs. Experiments on isolated lungs were carried out using 260- to 400-g adult male Wistar rats, six for the linopirdine study group, and five for the control group; treated in accordance with the Declaration of Helsinki and the Guide for Care and Use of

Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources 1996). All procedures were approved by the Animal Studies Committee at Charles University, Prague.

The lungs were excised as described by Herget and McMurtry (4), the rats were anaesthetised with sodium thiopental (50mg/kg i.p.) and ventilated (peak inspiratory pressure, 12cm of H2O; positive end expiratory pressure, 2cm of H2O) through a tracheal cannula with normoxic gas mixture (NGM); 21% O2, 5% CO2, 74% N2. Temperature of the lungs and recirculating perfusate was maintained at 38oC. The main pulmonary artery (PA) and the left ventricle were cannulated, and the lungs perfused at a rate of 4ml/min/100g via the PA with bicarbonate-buffered salt solution containing albumin (4g/100ml), meclofenamate (17µM), and nitro-L-arginin-metyl-ester (50µM, L-NAME). The pulmonary perfusion pressure was measured via a transducer connected to the inflow cannula (PowerLab; ADInstrumants Ltd., Chalgrove, Oxfordshire, UK).

For the study group, after 10 minutes of equilibration under normoxic gas mixture ventilation, a bolus injection of Linopirdine (230µg) was injected into the inflow cannula followed by a further 5 minutes of equilibration. A ventilatory challenge with hypoxic gas mixture (HGM); 0% O2, 5% CO2, 95% N2; was given at three intervals (15, 30, and 65 minutes). The hypoxic challenge was maintained until a stable maximal response had been reached. NGM ventilation was maintained for 10- and 30- minutes after the first and second hypoxic challenge, respectively. For the control group, the protocol was applied only without any linopirdine being administered.

The results are presented as means ± SE. They were evaluated statistically using unpaired t test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Figure 1 shows that the mean pulmonary perfusion pressure during exposure to hypoxic ventilation and normoxic ventilation showed no significant differences in their responses.

Figure 2 shows; firstly that linopirdine administration does not affect the basal mean pulmonary perfusion pressure; secondly, it shows that linopirdine potentiates hypoxic pulmonary vasoconstriction.

Figure 3 shows the difference in perfusion pressures during hypoxic ventilation from normoxic ventilation, in both the control and study group. This demonstrates that linopirdine is significant in potentiating the second and third hypoxic pulmonary vasoconstriction.

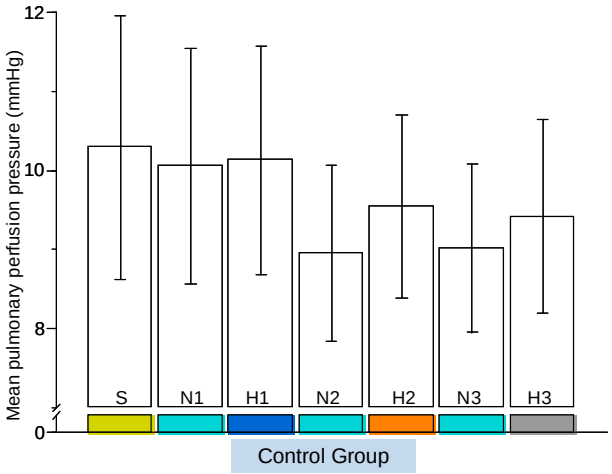


Figure 1. No hypoxic responses in the control

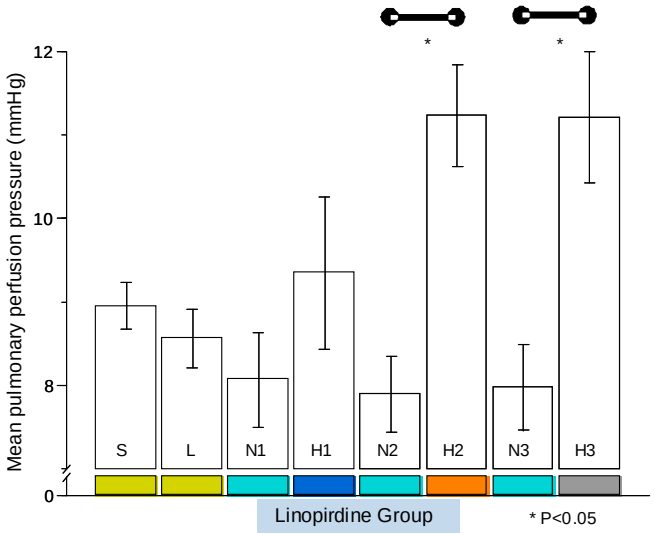


Figure 2. Linopirdine doesn't affect basal perfusion pressure, but prime HPV

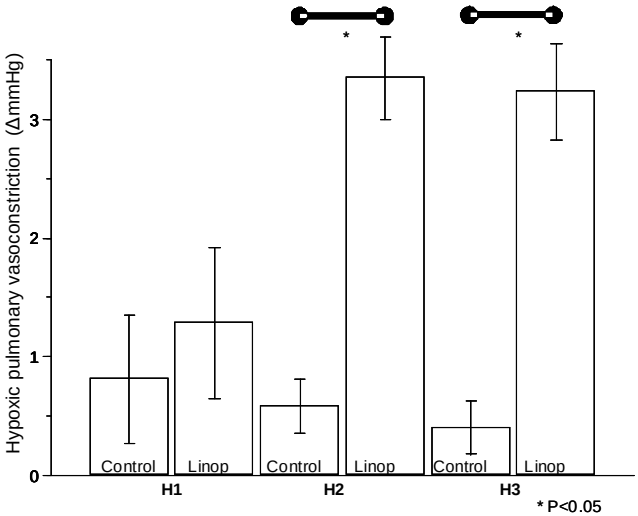


Figure 3. Linopirdine potentiates second and third HPV

Key: *S* – Stabilisation, *L* – after linopirdine administration, *N1, N2, N3* – normoxic ventilation, *H1, H2, H3* – 1st, 2nd, 3rd hypoxic ventilatory challenge respectively

There were no differences in basal perfusion pressures before the start of each hypoxia, between the study and control groups. The second and third responses to hypoxia were significantly statistically higher in the linopirdine study group compared to the control group.

Conclusion

We conclude that linopirdine induces HPV in saline perfused rat lungs. Hence, KCNQ channel activity is important in reactivity of pulmonary vessels to acute hypoxic challenge.

The KCNQ potassium channel blocker, linopirdine, was found to prime HPV, by way of constricting pulmonary vessels.

Acknowledgments

This study was supported by GAUK No. 2419/2007

References

1. McMurtry IF. Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. J Appl Physiol 56: 375-380, 1984.
2. Joshi S, Sedivy V, Hodyc D, Herget J, and Gurney AM. KCNQ modulators reveal a key role for KCNQ potassium channels in regulating the tone of rat pulmonary artery smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther jpet.108.147785, 2009.
3. Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. Nat Rev Neurosci. 2000 Oct;1(1):21-30
4. Herget J, McMurtry IF. Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. Am J Physiol. 1987 Sep;253(3 Pt 2):H574-81.

Proteomic changes of malignant cells induced by short-term treatment with valproic acid

Markéta Kostrouchová

Supervisor: prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.[2]
[1]Laboratory of Molecular Pathology, Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, [2]Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Introduction

Valproic acid (2-propylpentanoic acid) is a small branched fatty acid used for the treatment of epileptic seizures (absence, tonic-clonic and complex partial seizures), mania in bipolar disorder (1) and migraine prophylaxis (2). Studies done on various neoplastic cell lines showed that valproic acid induces cell differentiation, inhibits cell proliferation, increases apoptosis and immunogenicity and decreases angiogenic potency of neoplastic cells (1).

The mechanism of action of valproic acid has been linked to the potentiation of the inhibitory activity of GABA (γ-aminobutyric acid), inhibition of voltage-dependent Na+ channels, attenuation of NMDA (N-methyl-D-aspartate)-mediated excitation, interference with MAPK (mitogen-activated protein kinase) and Wnt/β-catenin signalling (1) and interference with inositol and arachidonate metabolism (3). It was also discovered that valproic acid acts as a potent HDAC (histone deacetylase) inhibitor (1).

Cancers arise by accumulation of genetic mutations and step-wise induction of epigenetic events that silence transcription of tumor suppressing genes and facilitate expression of tumor promoting genes. Epigenetic regulation is executed on the level of DNA by methylation of CpG islands (4) and on the level of post-translational modification of RNA (5) and chromatin proteins, histones in the first place (6). A decrease in gene expression brought about by low acetylation of histones is part of the cancer specific transcription profile that is characterized by low expression or complete elimination of expression of certain tumor suppressor genes. It seems possible to use inhibitors of HDACs as tools for the induction of expression of silenced genes.

In this work we studied the short-term effect (6 hours) of valproic acid (1mM and 5mM) on the urothelial carcinoma cell line 5637. Our focus was to establish the effect of valproic acid on the morphology, cell growth dynamics and proteome of 5637 cells.

Methods

We used light microscopy to evaluate the morphology of 5637 cells. Cell growth dynamics in response to treatment with valproic acid was determined by the total

amount of protein in cell cultures using Bradford assay. To analyze the proteome of 5637 cells we first used comparative two-dimensional liquid chromatography. In the first dimension or HPCF (high-performance chromatofocusing) proteins were separated based on their isoelectric points and eluted by pH gradient. Proteins from first dimension were then separated in the second dimension or HPRP (high-performance reversed phase) according to hydrophobicity and collected. Differential layouts of proteomes were made using the computer program DeltaVue. Selected samples were then analysed by mass spectrometry.

Results

We did not see any distinct morphological changes of 5637 cells after 6 hours incubation with valproic acid. The growth dynamics of 5637 cells were also not affected after 6 hours, but growth inhibition was seen after 24 hours for 5mM valproic acid and after 48 hours for both 5mM and 1mM valproic acid. Multiple chromatographic fractions were altered by valproic acid treatment and mass spectrometry identified cytoskeletal proteins as possible targets of valproic acid action.

Discussion

The antineoplastic potential of valproic acid was shown to act through the inhibition of HDACs and involves changed acetylation of histones H3 and H4 (1). Valproic acid is likely to affect the acetylation not only of histones but also of a wider spectrum of proteins that may play a role in the biological behavior of cancer cells. Our analysis identified cytoskeletal proteins especially keratins as possible targets of valproic acid. Cytokeratin 8 and cytokeratin 18 were recently shown to be acetylated and their acetylation affected by butyrate (7, 8). Butyric acid is also a short chain fatty acid and a HDAC inhibitor (9). It seems likely that altered chromatographic mobility of identified cytokeratins reflects the effect of valproic acid on their acetylation.

Acknowledgments

I thank Ing. Petr Novák, PhD from the Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic for help with mass spectrometry. For help with cell cultures and Bradford assay I thank Mrs. Ivana Tučková and Mrs. Martina Černá from the Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic and Ms. Veronika Kostrouchová from the Laboratory of Molecular Pathology, Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

References

1. Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. Folia Biol (Praha) 2007; 53(2): 37-49.
2. Evers S. Treatment of migraine with prophylactic drugs. Expert Opin Pharmacother 2008; 9(15): 2565-73.
3. Rosenberg G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? Cell Mol Life Sci 2007; 64(16): 2090-103.
4. Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Vertino PM. Predicting aberrant CpG island methylation. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(21): 12253-8.
5. Ryazansky SS, Gvozdev VA. Small RNAs and cancerogenesis. Biochemistry (Mosc) 2008; 73(5): 514-27.
6. Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. Mol Endocrinol 2005; 19(3): 563-73.
7. Leech SH, Evans CA, Shaw L, et al. Proteomic analyses of intermediate filaments reveals cytokeratin8 is highly acetylated--implications for colorectal epithelial homeostasis. Proteomics 2008; 8(2): 279-88.
8. Drake PJ, Griffiths GJ, Shaw L, Benson RP, Corfe BM. Application of high-content analysis to the study of post-translational modifications of the cytoskeleton. J Proteome Res 2009; 8(1): 28-34.
9. Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. J Neurochem 2009; 110(4): 1226-40.

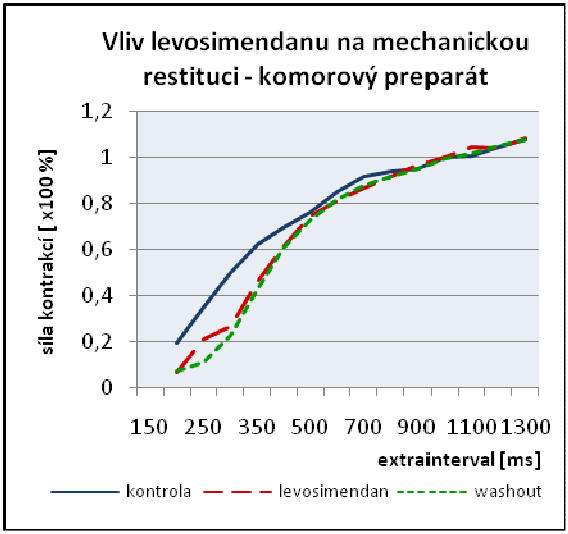
Vliv vápníkového senzitizátoru levosimendanu na kontraktilitu srdečních preparátů morčete

Tomáš Kazda

Školitelka: prof. MUDr. Marie Nováková, PhD.
Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

Úvod

Se zdokonalováním komplexní péče o pacienty s kardiovaskulárními onemocněními se jich stále více dožívá vyššího věku. Častěji se tak ale jejich základní onemocnění vyvine až do stavu srdečního selhání. V jeho terapii se postupně uplatňují i vápníkové senzitizátory, jejichž reprezentantem je levosimendan. V naší dřívější práci jsme se zabývali jeho účinkem na stažlivost a její obnovu v čase – mechanickou restituci – u multicelulárních srdečních preparátů morčete. Nejzajímavějším zjištěním v této předchozí studii byla deprese první fáze mechanické restituce u komorových svalů (1), obr.1.



Obr.1. Deprese první fáze mechanické restituce u komorového preparátu vlivem levosimendanu. Efekt není vymyvatelný.

Předpokládá se , že první, strmá fáze mechanické restituce je determinovaná především vápníkovým proudem přes L-typ Ca2+ kanálu, zatímco druhá, pozvolná fáze odráží obnovu schopnosti sarkoplasmatického retikula vyplavit vápník do cytoplasmy kardiomyocytu (2). Rozhodli jsme se navázat na naše předchozí zjištění a dále studovat změny mechanické restituce vlivem kombinace levosimendanu s dalšími látkami zasahujícími do vápníkového metabolismu. V této studii demonstrujeme alteraci kontraktility zásahem do dějů vnějšího vápníkového cyklu negativně inotropními látkami.

Metodika

Do studie bylo zahrnuto 18 morčat (obojího pohlaví, m=449,3±146,3g). Po celkové anestézii éterem byla zvířata usmrcena cervikální dislokací a po otevření hrudníku bylo srdce vystřiženo a umístěno do studeného (5°C) Krebs-Henseleitova roztoku (K-H: NaCl, 118 mM; NaHCO3, 24mM; KCl, 4,2 mM; KH2PO4, 1,2 mM; MgCl2, 1,2 mM; CaCl2, 1,25mM; glukóza, 5,5mM). Odtud bylo přeneseno do preparační misky a po vypreparování aorty perfundováno dle Langendorffa (35°C, 1.25mM Ca2+, perfúzní tlak 80mmHg). Záznam elektrogramu izolovaného srdce umožnil vyřadit nestabilní preparáty. Po 5 minutách perfúze byly ze srdce vypreparovány multicelulární preparáty – ouško levé síně a papilární sval z pravé komory (průměr 1,24±0,33mm).

Preparáty byly umístěny do horizontální lázničky pro snímání stimulovaných svalových kontrakcí (30°C, 10ml Krebs-Henseleitova roztoku syceného 95% O2 a 5% CO2, 1 Hz, stimulace proudovými impulsy s amplitudou rovnou dvojnásobku prahové hodnoty). Zvolená teplota i stimulační frekvence je pro tento model nejvhodnější (3). Po 30 minutové stabilizaci (KO) v K-H byly preparáty vystaveny na 30 minut účinku negativně inotropních látek: v první skupině - verapamil (VER, 300nM, n=6), ve druhé - kobalt (KOB, 1,5mM, n=6), ve třetí skupině experimentů bylo deprese stažlivosti dosaženo snížením koncentrace vápníku v K-H roztoku na jednu třetinu (1/3Ca2+K-H, n=6). V prvních dvou skupinách následovalo přidání levosimendanu (LEV, 150nM). EC50 hodnota pro sílu kontrakcí je 140nM (4). U třetí skupiny byl LEV nejprve přidán do roztoku s třetinovým množstvím vápníku (LEV 1/3Ca2+K-H) a až poté do roztoku s obvyklou koncentrací kalcia. Záznamy stimulovaných stahů byly pořizovány vždy v 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minutě. Na konci KO a také vždy v každé 30. minutě aplikace látky bylo podle zvláštního protokolu provedeno měření po stimulaci s různým extraintervalem (od 150ms do 1300ms) pro konstrukci křivky mechanické restituce.

Výsledky

Změny velikosti stimulovaných kontrakcí v jednotlivých situacích pro síňový i komorový preparát jsou shrnuty v Tabulce 1. Srovnávání jednotlivých fází experimentů bylo provedeno pomocí párového t-testu, resp. jednovýběrového t-testu s referenční hodnotou 1 pro porovnávání oproti kontrole. Křivky mechanické restituce jsou porovnávány opět pomocí párového t-testu (Tabulka 1).

Tabulka 1. Pokles, resp. nárůst síly kontrakcí v jednotlivých situacích (KO=100%). Ve druhé části statistická významnost rozdílů průběhu restitučních křivek v porovnání s KO. Signifikantní rozdíly (p≤0,05) vyznačeny *.

	VER	LEV po VER	KOB	LEV po KOB	1/3Ca2+K-H	LEV 1/3Ca2+K-H	LEV v K-H
	Síla kontrakcí						
Komora	62,4%	147,5%	9,4%*	88,1%	26,7%*	34,7%*	154,8%
Síň	65,7%	114,8%	15,4%*	102,2 %	36,2%*	82,1%*	309,7%
	Mechanická restituce						
Komora	0,037*	0,023*	0,008*	0,015*	0,05*	0,006*	0,018*
Síň	0,367	0,106	0,328	0,025*	0,172	0,730	0,227

Diskuse

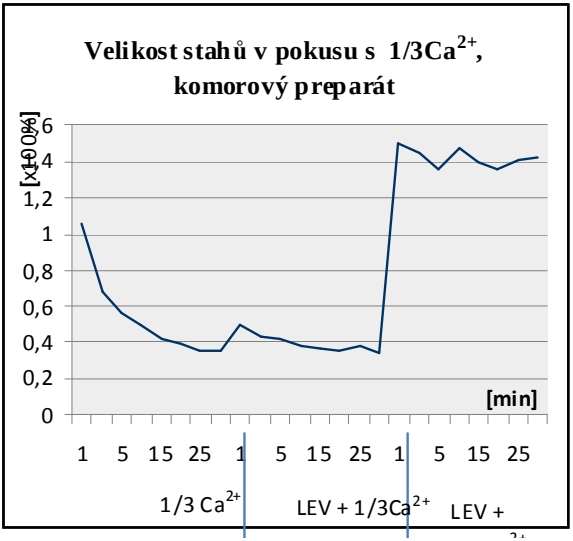
Výhodou kalciových senzitizátorů (v porovnání s jinými pozitivně inotropními látkami) je skutečnost, že nezvyšují intracelulární koncentraci vápníku. Zaměřují se totiž až na procesy, kterými vápník spouští svalovou kontrakci. Levosimendan působí na troponin C (TnC), a to tak, že zvyšuje jeho citlivost k vápníku. Tento účinek je ovšem Ca2+-dependentní - teprve po konformační změně TnC spuštěné vazbou Ca2+ se levosimendan váže hydrofobní interakcí na N-terminální doménu TnC a udržuje tuto aktivní konformaci troponinu (5). Tuto skutečnost jsme si potvrdili na experimentu s třetinovým množstvím vápníku. V této situaci byla i po podání levosimendanu velikost kontrakcí prakticky stejná, teprve až v poslední fázi, kdy už má levosimendan dostatek kalcia, je patrný vzestup velikosti kontrakcí (obr.2).

Křivka mechanické restituce popisuje obnovu stažlivosti v čase a její tvarové změny nepřímo informují o změněných poměrech v transportu vápníku mezi jednotlivými nitrobuněčnými kompartmenty, případně o metabolických změnách v srdečním svalu (2). Odchylky v průběhu restitučních křivek mohou reflektovat změny: ve stavu L-typu vápníkových kanálů, v obnově schopnosti uvolňovat vápník ze sarkoplasmatického retikula a změny obsahu Ca2+ v něm, v aktivaci ryanodinových receptorů jako odpověď na aktivaci dihydropyridinových receptorů sarkolemální membrány.

Studovali jsme změny průběhu mechanické restituce vlivem alterace všech výše uvedených možností. V této práci prezentujeme stavy po ovlivnění prvního bodu.

V našich experimentech jsme potvrdili účinek jednotlivých intervencí na velikost stahů u obou preparátů. Nárůst síly kontrakcí v LEV nebyl oproti KO statisticky významný. To však není v rozporu s našimi předchozími výsledky (nárůst síly o 288% u síně, resp.

225% u komory), protože v těchto pokusech levosimendan působil na farmakologicky intaktní srdeční preparáty. V experimentech prezentovaných v této práci však byly preparáty třicet minut pod vlivem verapamilu, resp. kobaltu, jejichž účinky (především u kobaltu) nejsou zcela vymyvatelné.



Obr.2. Velikost síly kontrakcí v pokusu s 1/3Ca2+. Kontrola = 100%

V poslední části naší práce jsme studovali vliv sníženého množství kalcia v extracelulárním prostoru. Při porovnávání našich dřívějších (Obr.1) a současných výsledků se nedopustíme výrazné chyby, protože dočasné snížení [Ca2+]i není tak radikálním zásahem do vápníkového metabolismu jako je tomu v předchozích případech. Zde je patrná podobnost s našimi předchozími výsledky - zřetelná deprese restituce stažlivosti v první, strmé fázi.

Porozumění dosud ne zcela objasněným jevům - jako je mechanická restituce - a fyziologickým regulacím, může přinést nové informace o pohybech vápníku v srdečních buňkách. Kromě teoretických přínosů se tak mohou rozšiřovat možnosti farmakologické intervence do těchto dějů detekcí nových potenciálních cílů, případně vypracováním teoretických předpokladů zvýšení účinnosti stávající léčby vhodnou kombinací (např. levosimendanu) s dalšími farmaky.

Použitá literatura

1. Nováková M, Kazda T, Říhová M. Effect of calcium-sensitiser levosimendan on guinea pig heart contractility. New frontiers in cardiovascular research 2008;1:73.
2. Dumitrescu C, Narayan P, Cheng Y, Efimov IR, Altschuld RA. Phase I and phase II of short-term mechanical restitution in perfused rat left ventricles. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282:1311-1319.
3. Bravený P, Šumbera J. Stažlivost myokardu a její stupňování na buněčné úrovni. Babákova sbírka, Avicenum, 1974, 150 s.
4. Stehr SN, Christ T, Rasche B. et al. Levosimendan reverses the myocardial depression induced by ropivacaine. J Mol Cel Cardiol 2006; 40(6):946.
5. Haikala H, Lindén IB. Mechanism of action of sensitizing drugs. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26 (Suppl. 1):S10-S19

Reakce kmenových buněk zubní pulpy a periodoncia na ozáření 60Co

Benjamín Víšek

Školitel: MUDr. Tomáš Soukup
Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Úvod

Kmenové buňky zubní pulpy (KBZP) a kmenové buňky periodoncia (KBP) jsou buněčné elementy, které participují na regenerativních procesech řady tkání v oblasti dutiny ústní. Správná funkce těchto buněčných linií tak hraje významnou roli v udržení homeostázy a řádné funkce jednotlivých partií této oblasti. Je přitom známa celá řada unikátních vlastností těchto buněk jako je schopnost sebeobnovy (1, 2) nebo významný proliferační a diferenciační potenciál (3), které tyto buněčné linie řadí do skupiny mezenchymálních kmenových buněk (MKB). Zároveň byly pozorovány další vlastnosti, díky kterým jsou tyto buněčné linie významně chráněny proti genotoxickému stresu. Patří sem např. přítomnost Abc transportérů (4), výrazně rozvinutý detoxikační systém (4) nebo vysoká schopnost reparace DNA (5). Některé publikace dále naznačují, že na rozdíl od hematopoetických kmenových buněk u MKB nedochází ani po významném ovlivnění některými cytostatiky (6) nebo jonizujícím zářením (7, 8) k indukci apoptózy, ale ke ztrátě proliferačního potenciálu a tedy k předčasné senescenci. Cílem této práce je pak posouzení vlivu jednorázového ozáření linií KBZP a KBP pomocí 60Co a získání informací o základních procesech, ke kterým u ozářených linií MKB dochází. Důraz je přitom kladen na posouzení míry indukce apoptózy a přechodu buněčných linií do senescence.

Metodika

V experimentu byly použity celkem 3 buněčné linie (2 x KBZP, 1 x KBP). Kultivace před ozářením probíhala v adherentních podmínkách v expanzním médiu MAPC + 2%FCS, suplementovaném růstovými faktory PDGF a EGF. Jako zdroj jonizujícího záření byl použit radioizotop 60Co s konstantním dávkovým příkonem 1Gy/min. Pro ozáření byly použity jednorázové dávky 2, 6 a 20Gy u KBZP a 20Gy u KBP. Analýza ozářených buněčných linií byla provedena 1., 3., 6. a 13. den po ozáření, přičemž do jednotlivých analýz byly zavzaty buňky přisedlé na kultivační nádobu i buňky odloučené, tvořící suspenzi. Ozářené buněčné linie v průběhu experimentu nebyly pasážovány, neozářené linie byly během celého experimentu pasážovány 2x (trypsin + EDTA). Viabilita, analýza počtu buněk a proliferační potenciál byly sledovány přístroji ViCell XR a Z2 Counter (Beckman Coulter). Analýza buněčného cyklu byla provedena značením propidium-jodidem a duálním značením anti-cyclin A2/7AAD. Výskyt časné

a pozdní apoptózy byl detegován na základě značení annexin V/7AAD. Data byla hodnocena využitím průtokové cytometrie (Cell Lab Quanta SC+MPL, Beckman Coulter). U ozářených linií byly sledovány karyotypové přestavby (R- a G-pruhování). Jako marker senescence byla ve světelném mikroskopu (Nikon) sledována aktivita beta-galaktosidázy (Sigma).Dále byly sledovány základní morfologické charakteristiky a změny ve fázovém kontrastu (Nikon). Jednotlivé sledované parametry ozářených buněčných linií byly porovnávány s hodnotami linií kontrolních, neozářených.

Výsledky

Při použití dávek 2 a 6Gy nebyly ve fázovém kontrastu oproti kontrolním liniím zaznamenány signifikantní morfologické změny. U dávek 20Gy byly u všech ozářených vzorků patrny ojedinělé degenerativní procesy (změny tvaru buněk, snížení nukleo-cytoplazmatického poměru, vakuolární degenerace). Kumulativní počet populačních zdvojení (PZ) se u KBZP z původních 5,8 (kontrolní linie) snižoval na 2,7 (2Gy), 1,0 (6Gy), resp. 0,9 (20Gy), u KBP bylo PZ 5,3 (kontrolní linie) a 1,4 (20Gy). Změřené hodnoty distribuce průměrů jednotlivých buněčných linií v rámci celého experimentu byly 16,2±4,1um (KBZP, kontrolní), 15,9±4,0um (KBZP, 20Gy), 14,6±5,9um (KBP, kontrolní), 15,0±4,0um (KBP, 20Gy). Viabilita KBZP z původních 92,0% (kontrolní linie) v rámci celé studie poklesla na 88,2% (2Gy), 87,1% (6Gy), resp. 87,0% (20Gy). U KBP dosáhla viabilita 95,0% (kontrolní linie), resp. 90,9% (20Gy). Procentuální zastoupení G2/M-fáze na celém buněčném cyklu v den 13 dosahovalo u KBZP hodnot 13% (2Gy), 29% (6Gy) a 63% (20Gy). U linie KBP bylo toto zastoupení rovno 45% (20Gy). Kontrolní linie přitom vykazovaly zastoupení 12% u KBZP, resp. 11% u KBP. Markery časné apoptózy (annexin V+/7AAD-) v rámci studie vykazovaly tyto hodnoty: 9,9±2,9% (KBZP, kontrolní), 12,0±2,5% (KBZP, 2Gy), 10,0±1,6% (KBZP, 6Gy), 11,1±2,9% (KBZP, 20Gy), 9,6±2,0% (KBP, kontrolní), 10,6±2,7% (KBP, 20Gy). Hodnoty charakterizující pozdní apoptózu (annexin V+/7AAD+) byly následující: 4,0±1,6% (KBZP, kontrolní), 4,1±1,9% (KBZP, 2Gy), 3,3±1,6% (KBZP, 6Gy), 4,9±1,8% (KBZP, 20Gy), 5,6±2,2% (KBP, kontrolní), 3,8±1,3% (KBP, 20Gy). Aktivita beta-galaktosidázy u ozářených linií vykazovala vzrůstající tendenci a to úměrně k použité dávce záření (data nebyla kvantifikována). U neozářených linií byly pozorovány karyotypové přestavby s četností 1-2%. Linie ozářené 2Gy vykazovaly aneuploidní a deleční změny v 10-15% hodnocených mitóz (souhrnná data pro KBZP a KBP), u vzorků ozářených 6 a 20Gy z důvodu výskytu nehodnotitelných změn nebyla provedena kvantifikace obrazu.

Diskuze

Ozáření linií KBZP, resp. KBP uvedenými dávkami vedlo ve všech případech ke snížení proliferačního potenciálu, přičemž toto snížení bylo proporcionální k použité dávce záření. Zároveň byl u ozářených vzorků patrný blok na úrovni G2-fáze buněčného cyklu, nejvýraznější u použité dávky 20Gy. Uvedený blok buněčného byl přitom patrný již první den po ozáření a přetrvával po celou dobu experimentu, což naznačuje přechod ozářených buněk do předčasné senescence. Tomu odpovídá i zvýšená aktivita beta-

galaktosidázy, opět ve vztahu k použité dávce jonizujícího záření. Detekce annexinu V/7AAD ukázala, že u ozářených buněčných linií není patrna statisticky významná indukce časné ani pozdní fáze apoptózy oproti kontrolním liniím. Ozáření se zásadně neprojevilo ani na viabilitě všech sledovaných populací, kde rozdíl množství neviabilních buněk mezi kontrolními a ozářenými liniemi nepřesáhl hodnotu 5% a to ani u nejvyšší použité dávky záření. Lze tedy usuzovat, že převládající reakcí linií KBZP a KPB na ozáření 60Co je předčasná senescence a nikoliv apoptóza. Je však nutné mít na zřeteli, že i přes nevýznamné ovlivnění základní morfologie ozářených buněčných populací zde dochází k výraznému poškození karyotypu. To, spolu s výše uvedenými výsledky, vede k závěru, že uvedené buněčné linie jsou schopny odolat i vysokým hodnotám jonizujícího záření, nicméně vlivem použitého záření dochází k selekci populací s výrazně poškozeným genomem. V dalších experimentech tak bude nutné ověřit, jak jonizující záření ovlivňuje další klíčové intracelulární procesy a to zejména na molekulárně-biochemické úrovni. Pro případné využití poznatků v klinické praxi pak bude přínosem sledování vlivu nižších dávek jonizujícího záření (< 2Gy) na uvedené typy MKB.

Práce byla podpořena grantem GA ČR č. 304/09/1568.

Použitá literatura

1. Mason PJ. Stem cells, telomerase and dyskeratosis congenita. BioEssays 2003, 25, 126-133.

2. Morrison SJ, Ho P, Weissman IL. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. Immunity 1996;5:207-16.

3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411):143-7.

4. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science 2002; 298(5593):597-600.

5. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. J Cell Physiol. 2006; 208(2):319-25.

6. Probin V, Wang Y, Zhou D. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. Free Radic Biol Med. 2007; 42(12):1858-65.

7. Meng A, Wang Y, Brown SA, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. Exp Hematol. 2003; 31(12):1348-56.

8. Serakinci N, Christensen R, Graakjaer J et al. Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart. Exp Cell Res. 2007; 313(5):1056-67.

Different ischemic preconditioning regimens affecting preservation injury of intestines

Ján Varga, Martin Bujdoš

Co-author: Pavel Staško[1]
Supervisor: prof. MVDr. Mikuláš Pomfy, CSc. [1], MVDr. Štefan Tóth[1], PhD., Mihai Oltean M.D.[2]
[1]Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, P. J. Šafárik University, Košice, Slovakia, [2]Institute for Clinical Sciences, Department of Surgery, University of Gothenburg and The Transplant Institute Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Sweden.

Decreasing the ischemia-reperfusion injury in intestinal transplantation (ITx) is a paramount strategy for improving graft recovery and function and avoiding potential postoperative complications. The current study explored the ability of two ischemic preconditioning (IPC) regimens to reduce preservation injury.

Sprague-Dawley rats were divided in three groups (n=11 each). In control group (group C) intestinal grafts were harvested and preserved in HTK solution. IPC was performed in the graft donor either through 4 cycles of mesenteric ischemia of 4 min each followed by 10 min of reperfusion (brief, group BIPC) or 2 ischemic cycles of 12 min each followed by 10 min of reperfusion (long, group LIPC). Grafts were perfused and stored in HTK and samples were taken before and after 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 18h and 24h. Preservation injury was scored using Park/Chiu scale. Goblet cells (GC), entero-endocrine cells (EEC) and serotonin producing EEC (SPEEC) were also studied by histochemistry and immunohistochemistry.

All groups showed progressively increasing morphologic injury and decreasing number of GC as well as higher EEC and SPEEC activity. Group C had the most advanced preservation injury followed by group BIPC. GC count was lowest in group C, followed by group BIPC. Comparison between group BIPC and group LIPC showed superior parameters (preservation injury, GC, EEC, SPEEC) in group LIPC.

In conclusion, an IPC regimen of 2 ischemic cycles of 12 min each followed by 10 min of reperfusion significantly decreases the preservation injury of the intestinal graft compared with non-manipulated grafts.

Background

Intestinal transplantation (ITx) represents causal treatment for patients with acute or chronic intestinal failure (1). One of the serious problem stems from damage to the graft which causes extreme susceptibility to small intestine mucosal ischemia (2, 3). Strategies, resulting in a reduction of the consequences of ischemic-reperfusion (IR)

injury and thus the ability to maintain mucosal morphology and function throughout clinically relevant storage periods may potentially have an enormous impact on the improvement of ITx fruitfulness. Ischemic preconditioning (IPC) has been reported to be one of the mechanisms that may protect the organ from the IR syndrome (4). Determination of the "gold standard" for IPC design still remains unanswered question of experimental studies.

Methods

Male Sprague-Dawley rats were divided in three groups (n=11 each); C – control group, BIPC – group with brief ischemic preconditioning regimen and LIPC – group with long ischemic preconditioning regimen. In untreated group (group C) harvest and preservation of unpreconditioned grafts was performed. IPC was performed in the graft donor either through 4 cycles of mesenteric ischemia of 4 min each followed by 10 min of reperfusion (brief, group BIPC) or 2 ischemic cycles of 12 min each followed by 10 min of reperfusion (long, group LIPC). Grafts underwent preservation in Custodiol HTK (histidine-tryptophan-ketoglutarate) preservation solution. Bioptic samples were taken during preservation in time 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 18h and 24h (samples T0, T3, T6, T9, T12, T18 and T24). For morphological changes determination (Histopathological injury index, HII) Hematoxylin-Eosin (HE) staining was used. HE-stained sections were scored using Park/Chiu grading system adapted from Quaedacker et al. (2000) (5). Goblet cells (GC) population was detected using Alcian blue staining. For total identification of entero-endocrine cells (EEC) argyrophilic method by Grimelius-Pascual was used. Serotonin producing EEC (SPEEC) were detected using monoclonal antibody to serotonin.

Results

Histopathological injury index (HII)

Increasing of morphological injury from the start (T0) till the end of preservation (T24) was detected in all groups. However, the highest values of HII were observed in control group C. Preconditioned grafts of BIPC and LIPC group had markedly lower range of morphological injury in all bioptic samples. Mutual comparing of pretreated groups has shown improved intestinal morphology in group LIPC (Fig 1).

Goblet cells (GC) quantification

GC decrease with expanding scope of intestinal damage, accordingly the decrease of GC with time of preservation was observed in all groups. The most pronounced descent of GC population was detected in donors of control group C followed by BIPC and LIPC group (Fig 2).

Entero-endocrine cells (EEC) detection

In all groups high EEC activity was detected during first 3-5 hours of preservation with sequent decrease in other time points of preservation. Almost in all samples were the

EEC activities highest in unpreconditioned group (group C). Lowest EEC activities were observed mostly in samples of group LIPC (Fig 3).

Serotonin producing entero-endocrine cells (SPEEC) detection

In all groups accrual of SPEEC activity was detected at the beginning of preservation and successive wane in other time-periods of preservation. Group C has shown the highest SPEEC activity in all samples with zenith in sample T6. Comparing of samples from BIPC and LIPC showed lower SPEEC activities in group pretreated by long IPC regimen (LIPC) with highest values in sample T3 (Fig 3).

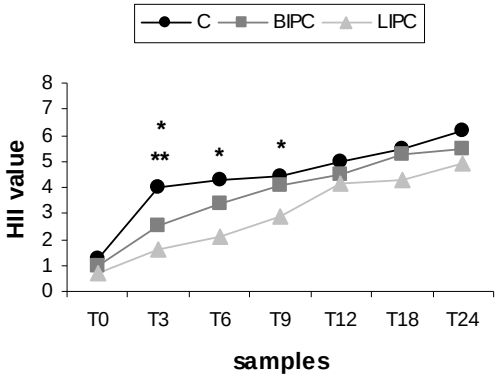


Fig 1. Histopathological injury index (HII) of intestinal grafts. * p<0.05 C vs. BIPC (T3) and BIPC vs. LIPC (T3) and C vs. LIPC (T6) and C vs. LIPC (T9); ** p<0.01 C vs. LIPC (T3).

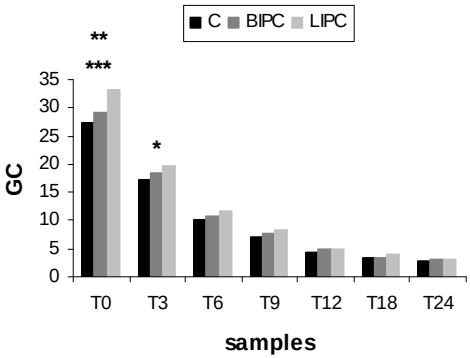


Fig 2. Quantification of goblet cells (GC) in graft mucosa. * p<0.05 C vs. LIPC (T3); ** p<0.01 C vs. BIPC (T0); *** p<0.001 C vs. LIPC (T0).

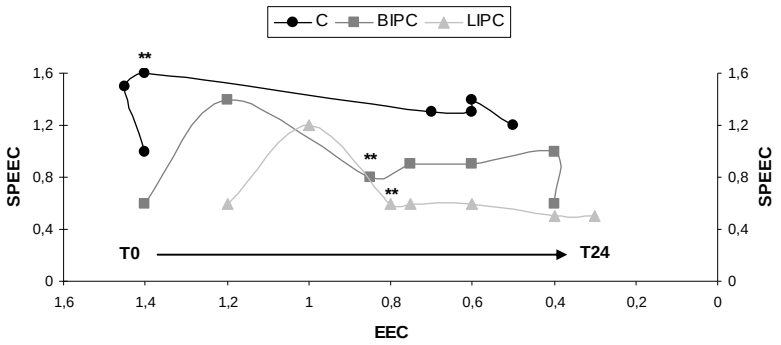


Fig 3. Correlation between EEC and SPEEC populations. ** p<0.01 C vs. BIPC (T6) and C vs. LIPC (T6)

Discussion

Plenty of studies verified increasing in intestinal damage during preservation using hematoxylin-eosin staining method and Park/Chiu scoring system (6-7). Salehi et al. described as a border for intestinal graft viability the time from 6-8h in University of Wisconsin (UW) preservation solution (3). Insignificant differences were observed in study comparing two different preservation solutions clinically standardly used, UW and Custodiol (histidine-tryptophan-ketoglutarate; HTK) while using of Park/Chiu scoring system (8). In our study HII after 9h of preservation reached the value in unpreconditioned grafts (control group C) 4.4 but in preconditioned grafts (BIPC and LIPC) reached similar value after 12h of preservation, i.e. BIPC=4.5 and LIPC=4.17. This finding showed a possibility to move the border for cold storage of intestines from 9h to 12h by using of IPC. Significantly lower mucosal damage of intestines, confirmed by Park/Chiu grading system, showed also study of Sola et al., in group with IPC (Prec + CI; 10min of mesenterial ischemia + 5min of reperfusion), Prec + CI = 2.0 after 4h of cold storage in compare to group without IPC (CI = 2.9) (4).

Progressive decline of goblet cells (GC) due to ischemic injury during cold storage evokes depression of mucus production and its loss of protective properties for intestinal mucosa (2). Taguchi et al. described the decrease of mucus content in GC as well as villus cells during preservation of intestines in UW solution as one of the characteristic signs of poor graft viability (9). In our study for the first time the changes in GC amounts during preservation of preconditioned intestines are described in detail. Our data show rapid fall of GC populations with increasing preservation time in all groups however the progress of GC falling in groups with IPC is less highlighted.

Kaihara et al. have shown the decrease of luminal serotonin concentration as well as number of serotonin positive cells in intestinal mucosa with increasing cold ischemic and warm ischemic time (10). Reduction of SPEEC with cold storage time confirmed the study of Balaz et al. too (1). Decrease of serotonin mucosal concentration in

intestines during preservation was detected in different studies (7, 8). There is still no evidence of changes in EEC and SPEEC populations during preservation when preconditioned grafts were preserved. Comparing of unpreconditioned (control group C) and preconditioned grafts (BIPC and LIPC) by EEC and SPEEC detection has shown lower range of graft damage in IPC groups, especially when donors were pretreated by long regimen IPC (LIPC).

In conclusion, an IPC regimen of 2 ischemic cycles of 12min each followed by 10min of reperfusion significantly decreases the morphological preservation injury of the intestinal graft compared with non-manipulated grafts.

References

1. Balaz P, Kudla M, Lodererova A, Oliverius M, Adamec M. Preservation injury of the small bowel graft in clinical small bowel transplantation. Bratisl Lek Listy 2007; 108:516-518.
2. Varga J, Staško P, Tóth Š, Pristášová Z, Bujdoš M, Pomfy M. Development of jejunal graft damage during intestinal transplantation. Ann Transplant 2009; 14:62-69.
3. Salehi P, Zhu JZ, Castillo EG, Avila J, Lakey J, Churchill TA. Preserving the mucosal barrier during small bowel storage. Transplantation 2003; 76:911-917.
4. Sola A, De Oca J, González R, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. Ann Surg 2001; 234:98-106.
5. Quaedackers JS, Beuk RJ, Bennet L, et al. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. Transplant Proc 2000; 32:1307-1310.
6. Balaz P, Kudla M, Lodererova A, Oliverius M, Adamec M. Preservation injury to the human small bowel graft: jejunum vs. ileum. Ann Transplant 2007; 12:15-18.
7. Matia I, Balaz P, Jackanin S, et al. Serotonin levels in the small bowel mucosa as a marker of ischemic injury during small bowel preservation. Ann Transplant 2004; 9:48-51.
8. Balaz P, Matia I, Jackanin S, et al. Preservation injury of jejunal grafts and its modulation by custodiol and university of wisconsin perfusion solutions in wistar rats. Eur Surg Res 2004; 36:192-197.
9. Taguchi T, Yamada T, Suita S, Ohta M. The significance of cytological examination on reperfusion in rat small intestinal transplantation. Virchows Arch 1995; 427:71-76.

10. Kaihara S, Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Tanaka K. Serotonin as a useful parameter for cold and warm ischemic injury in small bowel transplantation. Transplantation 1997; 64:405-410.

Antiapoptotic protein survivin and its expression in malignant melanoma

Anna Antošíková

Spoluautorka: Erika Gondová
Školiteľ: Doc. MUDr. Marian Adamkov, CSc.
Ústav histológie a embryológie, Jesseniova lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Martin

Abstract

Survivin is a multifunctional protein that acts as an apoptosis inhibitor, plays a key role in cell division and enhances angiogenesis. There are large differences of survivin expression in malignant tumors on the one hand and corresponding normal tissues on the other hand. Therefore, it is a potential tumor marker.

Methods

We examined the expression of survivin in a panel of 25 malignant melanomas by immunohistochemical staining using anti-survivin antibody (DAKO, Clone 12C4). In each section, we assessed the percentage of positively stained tumor cells, the intensity of staining and its subcellular localization.

Results

Survivin was found in 23 out of 25 cases (92%). Nuclear staining only was present in 2 out of 23 cases (8.7%), while cytoplasmic staining only was seen in 3 out of 25 cases (13%). Combined nuclear as well as cytoplasmic expression of survivin was demonstrated in 18 out of 23 cases (78.3%). In 2 cases revealing nuclear staining only, worse histological features were more pronounced than in 3 cases with cytoplasmic staining only.

Discussion

Our results suggest that nuclear positivity for survivin may correlate with the degree of malignancy. In addition, we conclude that overexpression of survivin protein involved in the pathogenesis of melanoma might represent an important diagnostic marker.

Tab. 1: Dva prípady malígneho melánomu len s jadrovou imunopozitivitou (N)

Číslo vzorky	s. l.	Breslow	Clark	Mitotická aktivita
22	N	5.0 mm	IV	3/mm2
23	N	6.0 mm	V	7/mm2

Tab. 2: Tri prípady malígneho melanómu s cytoplazmatickou imunopozitivitou (C)

Číslo vzorky	s. l.	Breslow	Clark	Mitotická aktivita
1	C	0.3 mm	I	0/mm2
2	C	0.4 mm	I	0/mm2
3	C	0.35 mm	I	0/mm2

s. l. – subcelulárna lokalizácia survivinu

Exprese genu RECK v plicní tkáni pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem

Lukáš Řehoř

Spoluautor: Martin Svatoň
Školitelé: MUDr. Vlastimil Kulda, RNDr. Martin Pešta, PhD.
Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

Úvod

RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) je mebránově vázaný glykoprotein, který negativně reguluje aktivitu matrixových metaloproteináz (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) a inhibuje angiogenezi. V současné době se ukazuje, že exprese tohoto genu je často snížena v nádorové tkáni (1,2). Nemalobuněčný plicní karcinom (non-small cell lung cancer, NSCLC) patří mezi maligní nádory se špatnou prognózou a řadí se na přední místa úmrtnosti na nádorová onemocnění nejen v České republice, ale po celém světě (3). Už delší dobu jsou známy endogenní inhibitory matrixových metaloproteináz označované TIMP-1 až TIMP-4 (Tissue inhibitors of metalloproteinases) (4). Hlavní rozdíl mezi těmito inhibitory a nově objeveným proteinem RECK je v lokalizaci, TIMPy jsou difuzibilní, zatímco RECK je membránově vázaný.

Bylo již popsáno několik cest vedoucích ke snížení exprese genu RECK. Do dvou z nich je zapojen onkogenní K-ras. Jednak zvyšuje vazbu DNA methyltransferasy DNMT3b na promotor RECK genu a indukuje jeho methylaci v CpG ostrůvcích (5), druhá terorie předpokládá, že Ras indukuje fosforylaci nebo další modifikace Sp1/Sp3 faktorů, které zvyšují jejich vazbu na SP1 místo na promotoru a tím snižují transkripční aktivitu RECK genu (6).

V naší práci jsme porovnávali expresi mRNA RECKu v různých histologických typech a klinických stadiích NSCLC. Dále jsme se zaměřili na vztah mezi methylací promotoru genu pro RECK, expresí mRNA tohoto genu, bezpříznakovým obdobím (DFI) a celkovým přežitím (OS) u pacientů s NSCLC.

Metodika

Studovaná skupina zahrnovala 50 pacientů s NSCLC (medián věku 62,4 let, rozmezí 47,5 - 77,8 let, stadium IA 12 (24%) pacientů, stadia IB – IIIA 38 (76%) pacientů) operovaných v letech 2005-2007. Párové vzorky resekované tkáně získané od každého pacienta (nádor – normální plicní tkáň) byly ihned po odběru zmraženy na -70°C a při této teplotě skladovány do doby zpracování. Všechny vzorky tkání byly histologicky

ověřeny – zastoupení jednotlivých histologických typů bylo následující: epidermoidní karcinom 25 (50%), adenokarcinom 19 (38%), ostatní 6 (12%).

Stanovení exprese mRNA metodou RT real-time PCR. Celková RNA byla izolována ze 100 mg tkáně (Fast RNA Pro Green Kit, Q-BIOgene, USA), reverzní transkripce (RT) byla následně provedena ze 3 µg izolované RNA za použití oligo d(T)21 jako primeru (Superscript III Reverse Transcriptase, Life Technologies, USA). Sekvence primerů pro kvantifikaci byla následující: forward primer 5´-ATCATTCCCGTCGATCACTATC-3´, reverse primer 5´-ATATGTCCAGAGCAAGTGCAAG-3´. Ve všech vzorcích byla změřena také exprese GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa, housekeeping gen). Postup kvantifikace GAPDH je uvedený v dřívější publikaci našeho pracoviště (7). Výsledky exprese mRNA pro RECK jsou uváděny jako normalizované hodnoty, tj. vztažené k expresi housekeeping genu GAPDH.

Určení methylačního stavu promotoru genu pro RECK. Po izolaci DNA z 20 mg tkáně (NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) byla provedena konverze DNA bisulfitovou metodou (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research, USA). DNA po konverzi byla užita ke zjištění methylačního stavu promotoru pomocí methylačně specifické PCR. Sekvence primerů převzatých z publikace autorů Chang et al. (8) byla modifikována, primery pro methylovanou sekvenci: M-sense 5'-AATAAAGAGTTTTGGTACGGGGTAC-3', M-antisense 5'-AAAACCGCGAAATACTCGAA-3'; primery pro nemethylovanou sekvenci: U-sense 5'-TAAAGAGTTTTGGTATGGGGTATGT-3', U-antisense 5'-CTCCAAAACCACAAAATACTCAAA-3'.

Výsledky

Tabulka 1 Rozdíly v expresi genu RECK

N	Tkáň	exprese RECK/GAPDH (medián)	Wilcoxon
50	NSCLC	0,0397797	p=0,0032
49	Kontrolní tkáň	0,1102843	
25	Epidermoidní karcinom	0,0297737	p=0,0003
24	Kontrolní tkáň	0,1043990	
19	Adenokarcinom	0,1138185	p=0,3208
19	Kontrolní tkáň	0,1359807	
25	Epidermoidní karcinom	0,0297737	p=0,0051
19	Adenokarcinom	0,1138185	

Tabulka 2 Vztah methylačního stavu promotoru a exprese genu RECK

N	Methylace promotoru genu pro RECK	exprese RECK/GAPDH (medián)	Wilcoxon
24	ANO	0,0283514	p=0,0400
24	NE	0,0560349	

Zaznamenali jsme nižší expresi mRNA genu RECK v NSCLC nádorové tkáni ve srovnání s normální plicní tkání (p=0,0032). Také v histologické podskupině epidermoidního karcinomu jsme prokázali nižší expresi mRNA genu RECK ve srovnání s normální plicní tkání (p=0,0003), ale nenalezli jsme rozdíly v expresi mezi adenokarcinomem a normální plicní tkání. Epidermoidní karcinomy vykazovaly nižší expresi RECKu ve srovnání s adenokarcinomy (p=0,0051), výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Dále jsme prokázali, že existují rozdíly v expresi podle stadia nemoci. Vyšší exprese byla nalezena u stadia IA ve srovnání se stadii IB-IIIA (p=0,0455). Zjistili jsme, že u vzorků s methylovaným promotorem genu pro RECK je signifikantně nižší exprese mRNA tohoto genu (p=0,0400), viz tabulka 2. Nezjistili jsme žádný vztah methylace promotoru a exprese genu RECK ke klinickopatologickým hodnotám (DFI, OS).

Diskuse

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou enzymy, které se uplatňují v mnoha procesech spojených s nádorovým růstem a metastazováním (proteolyticky degradují komponenty extracelulární matrix a bazálních membrán, jsou důležité pro angiogenezi). Proto molekuly regulující jejich expresi a funkci přitahují pozornost například i jako možný cíl protinádorové terapie. Předchozí výzkum MMP inhibitorů identifikoval molekulu TIMP-1 jako slibný prognostický ukazatel (9). Další zajímavou molekulou inhibující MMP je RECK, jehož expresi jsme stanovovali ve vzorcích NSCLC nádorové tkáně. Potvrdili jsme výsledky přechozích publikovaných prací (8,10), že exprese RECKu je snížena v NSCLC nádorové tkáni ve srovnání s normální plicní tkání. Navíc jsme prokázali, že existují rozdíly v expresi mezi jednotlivými histologickými typy NSCLC, nižší exprese byla nalezena u epidermoidních karcinomů ve srovnání s adenokarcinomy. Exprese RECKu je závislá i na stadiu oneocnění, u stadia IA (lepší prognóza) byla zaznamenána vyšší exprese ve srovnání se stadii IB-IIIA (horší prognóza), podobné výsledky publikovali Takemoto et al (10), ale jen u adenokarcinomů. Vzhledem k těmto výsledkům jsme předpokládali, že pacienti mající vyšší expresi RECKu by mohli mít delší bezpříznakové období (DFI) a celkové přežití (OS), ale tuto hypotézu se nám nepodařilo prokázat. Ukázali jsme, že v NSCLC nádorové tkáni methylace promotoru genu RECK snižuje expresi mRNA tohoto genu a je tudíž jedním z jeho regulačních mechanismů.

Naše výsledky potvrzují, že RECK může být pokládán za tumor supresorový gen a zajímavý cíl dalšího výzkumu inhibitorů matrixových metaloproteináz.

Práce byla podpořena grantem IGA MZCR NR 9343-3.

Použitá literatura

1. Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. Cancer Metastasis Rev 2003; 22 (2-3): 167-175.

2. Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR. RECK - a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. Cancer Metastasis Rev 2007; 26 (3-4): 675-683.

3. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. Mayo Clin Proc 2008; 83 (5): 584-594.

4. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol 1997; 74 (2): 111-122.

5. Chang HC, Cho CY, Hung WC. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. Cancer Res 2006; 66 (17): 8413-8420.

6. Chang HC, Liu LT, Hung WC. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. Cell Signal 2004; 16 (6): 675–679.

7. Pesta M, Topolcan O, Holubec L Jr a spol. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. Anticancer Res 2007; 27 (4A): 1863-1867.

8. Chang HC, Cho CY, Hung WC. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. Cancer Sci 2007; 98 (2): 169-173.

9. Gouyer V, Conti M, Devos P a spol. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. Cancer 2005; 103 (8): 1676-1684.

10. Takemoto N, Tada M, Hida Y a spol. Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung. Lung Cancer 2007; 58 (3): 376-383.

Možnosti fenotypových metod v detekci širokospektrých beta-laktamáz v mikrobiologické praxi

Miroslava Htoutou Sedláková

Spoluautor: Vojtěch Hanulík
Školitel: Prof. MUDr. Milan Kolář, PhD.
Ústav mikrobiologie FNOL a LF UP v Olomouci

Úvod

Enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz patří v současné době k obávaným bakteriálním patogenům. Klinicky významné jsou především ESBL a AmpC enzymy, které jsou schopné hydrolyzovat peniciliny, monobaktamy a cefalosporiny se širokým spektrem účinku. Účinek obou skupin se liší u cefepimu s odolností vůči AmpC beta-laktamázám a u cefoxitinu, který je odolný naopak vůči ESBL. ESBL a AmpC enzymy se dále odlišují ve svých inhibitorech, pro ESBL je specifickým inhibitorem kyselina klavulanová, pro AmpC je to kyselina 3-aminofenylboritá. Výskyt širokospektrých beta-laktamáz je klinicky velmi významný. Zvyšuje riziko selhání antibiotické léčby, s tím související morbiditu i mortalitu a v neposlední řadě ekonomické náklady na léčbu (1). Například Kang a jeho spolupracovníci zjistili signifikantně vyšší selhání iniciální antibiotické léčby u pacientů se spontánní bakteriální peritonitidou způsobenou ESBL-pozitivními kmeny (73,3 %) v porovnání s peritonitidou ESBL-negativní etiologie (16,7 %). Rovněž prokázali u pacientů s ESBL-pozitivními původci vyšší 30-denní mortalitu (60 %) v porovnání s pacienty s non-ESBL-peritonitidou (23,3 %) (2).

Důležitou vlastností ESBL- a AmpC-pozitivních bakterií je sdružená rezistence k dalším antimikrobním přípravkům, např. k aminoglykosidům, fluorochinolonům a tetracyklinům. Velmi závažná je dále možnost horizontálního šíření genů rezistence mezi příbuznými i nepříbuznými bakteriálními druhy (3). ESBL a AmpC enzymy jsou popisovány i v České republice. Kolář a kol. v multicentrické studii z roku 2004, zahrnující 16 zdravotnických zařízení, prokázali produkci ESBL u 26 % kmenů Klebsiella pneumoniae, přičemž na jednotkách intenzivní péče činila prevalence dokonce 39 % (4). Podle European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) byla pro rok 2008 v ČR prevalence ESBL-pozitivních kmenů Klebsiella pneumoniae 47,7 % a v případě druhu Escherichia coli 9,9 %. Výskyt ESBL a AmpC byl prokázán i v komunitním prostředí ČR. Čekanová a kol. dokumentují 1,2 % prevalenci ESBL-pozitivních bakterií v gastrointestinálním traktu osob v komunitním prostředí. Ve všech případech se jednalo o kmeny Escherichia coli s produkcí ESBL typu CTX-M. AmpC-pozitivní izoláty byly určeny jako Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes a Escherichia coli (5).

Velkým problémem zůstává laboratorní detekce širokospektrých beta-laktamáz. Italská studie z roku 2006 prokázala, že pouhých 41,7 % laboratoří správně detekovalo všechny testované ESBL-producenty, ve španělské studii z roku 2008 to bylo již 91 % laboratoří, nicméně u AmpC-kmenů jen 47,4 % (6, 7).

Cílem předložené práce bylo porovnání senzitivity fenotypových metod k detekci produkce výše uvedených enzymů.

Metodika

Bylo testováno 60 kmenů čeledi Enterobacteriaceae, u kterých byla molekulárně-biologickými metodami prokázána přítomnost genů kódujících ESBL nebo AmpC enzymy. Kmeny byly identifikovány standardními mikrobiologickými metodami a automatizovaným systémem Phoenix (Becton Dickinson).

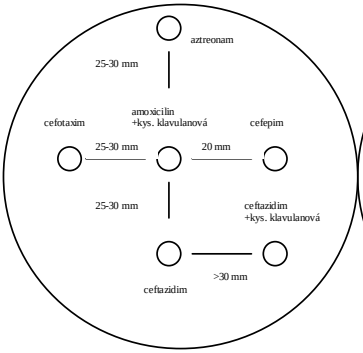
U izolátů byly hodnoceny minimální inhibiční koncentrace (MIC) vybraných antibiotik, výsledky diskové difuzní metody a přesnost automatizovaného systému Phoenix (Becton Dickinson). U ESBL-pozitivních kmenů byla hodnocena senzitivita modifikované metody se stanovením MIC cefoxitinu a poměru MIC cefoperazonu s kombinací cefoperazon/sulbaktam, dále ESBL-E-testu (AB Biodisk) a modifikovaného Double Disk Synergy Testu (DDST) (Obr. 1). AmpC kmeny byly testovány modifikovanou AmpC diskovou metodou za použití kyseliny 3-aminofenylborité (Obr. 2) Pro současnou detekci ESBL a AmpC byla použita mikrodiluční metoda s modifikovanou sestavou antimikrobních látek, včetně kombinací se sulbaktamem, tazobaktamem a kys. 3-aminofenylboritou.

Výsledky

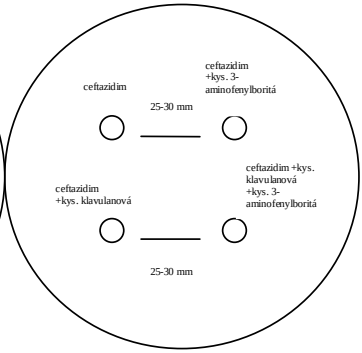
Celkem bylo testováno 60 enterobakterií. Pomocí PCR byla u 46 kmenů stanovena produkce ESBL a u 14 kmenů produkce AmpC. Testované kmeny vykazovaly při použití diluční mikrometody vysokou falešnou citlivost k cefoperazonu (27 %), cefotaximu (32 %), ceftazidimu (28 %) a cefepimu (35 %). Rovněž u diskové metody bylo velké procento kmenů identifikováno jako falešně citlivé k cefalosporinům III. a IV. generace (cefoperazon 15 %, cefotaxim 10 %, ceftazidim 55 %, cefepim 80 %). Senzitivita detekce ESBL pomocí automatizovaného systému Phoenix (Becton Dickinson) byla vysoká (98 %), ale u souboru AmpC-pozitivních kmenů to bylo pouhých 36 %. Vysokou senzitivitu vykazovaly testy specifické pro daný typ širokospektré beta-laktamázy: ESBL-E-test odhalil 93 % ESBL-pozitivních kmenů, modifikovaný DDST vykazoval 100% senzitivitu pro ESBL producenty a AmpC test s kys. 3-aminofenylboritou správně detekoval 93 % AmpC-pozitivních kmenů. V souboru ESBL-pozitivních kmenů bylo prokázáno 87 % kmenů s MIC cefoxitinu menší nebo rovnou 16 mg/l a zároveň s hodnotou MIC cefoperazonu minimálně 4-krát větší než MIC cefoperazon/sulbaktamu. Senzitivita modifikované diluční mikrometody činila 93 % pro ESBL a 90 % pro AmpC beta-laktamázy. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 2.

Diskuze a závěr

Výsledky předložené studie prokázaly velké procento falešné citlivosti v případě standardní diluční mikrometody a diskové difuzní metody (10 - 80 %). Je zřejmé, že detekce širokospektrých beta-laktamáz musí být založena na specifických fenotypových metodách, jako jsou především modifikovaný DDST a AmpC disková metoda. Také ESBL-E-test vykazoval velmi dobré výsledky, nicméně pro vysoké provozní náklady nemusí být vhodný pro běžnou mikrobiologickou praxi. Standardní diluční mikrometoda s modifikovanou sestavou antibiotik se zdá být velmi výhodnou metodou vzhledem ke skutečnosti, že splňuje podmínky vysoké senzitivity, současné detekce obou typů enzymů, jednoduchého provedení a nižší finanční náročnosti.



Obrázek 1: Modifikovaný DDST k průkazu ESBL enzymů



Obrázek 2: Modifikovaný AmpC-diskový test za použití kyseliny 3-aminofenylborité

Tabulka 1: Srovnání senzitivit jednotlivých testovaných fenotypových metod v souboru ESBL- a AmpC-producentů

Metoda	Senzitivita (v %)	
	ESBL	AmpC
MIC	65 - 73	
Disková difúzní	20 - 90	
mMIC1)	93	90
Phoenix	98	36
mDDST2)	100	-
E-test	93	-
MIC - CXT a CPR/CPS3)	87	-
AmpC disk test	-	93

1) standardní mikrodiluční metoda s modifikovanou sestavou antibiotik
2) modifikovaný Double-Disk Synergy Test
3) MIC pro cefoxitin a poměr MIC cefoperazonu k MIC cefoperazonu se sulbaktamem

Podpořeno výzkumným záměrem MSM6198959223 a grantem IGA č. 9950-3.

Použitá literatura

1. Kolář M. Klinický význam širokospektrých ß-laktamáz a zkušenosti s jejich identifikací v mikrobiologické praxi. Klin mikrobiol inf lék 2007; 13 (5): 195-205.

2. Kang CI, Sung HK, Park WB et al. Clinical Outcome of Bacteremic Spontaneous Bacterial Peritonitis due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella Pneumoniae. Korean J Intern Med 2004; 19 (3): 160-165.

3. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS II. Extended-Spectrum ß-Lactamases: Epidemiology, Detection, and Treatment. Pharmacotherapy 2001; 21 (8): 920-928.

4. Kolář M, Látal T, Čermák P et al. Prevalence ESBL-pozitivních kmenů Klebsiella pneumoniae v České republice a jejich molekulárně-biologická analýza. Klin mikrobiol inf lék 2005; 11 (3): 92-99.

5. Čekanová L, Kolář M, Chromá M, Sauer P, Sedláčková M and Koukalová D. Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. Med Science Monit 2009; 15 (7): BR202-206.

6. Luzzaro F, Gesu G, Endimiani A et al. Performance in detection and reporting beta-lactam resistance phenotypes in Enterobacteriaceae: a nationwide proficiency study in Italian laboratories. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 55 (4): 311-318.

7. Conejo MC, Mata C, Navarro F, Pascual A and the GEMARA collaborative group. Detection and reporting beta-lactam resistance phenotypes in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: a multicenter proficiency study in Spain. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 62 (3): 317-325.

Omega-3 nenasýtené mastné kyseliny a Atorvastatín ovplyvňujú medzibunkovú komunikáciu v myokarde a v aorte hypertriacylglycerolemických potkanov

Lucia Kolenová

Školitelia: RNDr. Katarína Dlugošová, RNDr. Narcis Tribulová, DrSc.
Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava

Úvod

Priama medzibunková komunikácia v srdci a v cievach je nevyhnutná pre zachovanie homeostázy a funkcie tkanív. Umožňuje koordinovanú fyziologickú činnosť kardiovaskulárneho (KV) systému. Priamu komunikáciu, t. j. prenos elektrických a molekulových signálov, zabezpečujú medzibunkové kanály, ktoré tvoria proteíny, nazývané konexíny (Cx., (1)). Cx kanály nachádzame v špecializovaných úsekoch cytoplazmatickej membrány, v „gap junctions“, ktoré tvoria tzv. komunikačné spojenia. Dominantný Cx v srdci a v cievach je Cx43. Odborná literatúra (2, 3) poukazuje na abnormity medzibunkovej komunikácie u ľudí, aj v experimentálnych zvieratách. Tieto zmeny vyplývajú zo zmien topológie, expresie, prípadne tiež fosforylácie Cx43, pri rôznych KV chorobách, aj pri vzniku život ohrozujúcich arytmií. Zatiaľ sú však málo dostupné štúdie zamerané na cielené ovplyvnenie medzibunkovej komunikácie pre zlepšenie funkcie poškodených ciev a chorého srdca, aj zníženia rizika výskytu malígnej arytmie.

Epidemiologické a klinické štúdie (4, 5) dokumentujú kardioprotekčné a antiarytmické účinky omega-3 nenasýtených mastných kyselín (omega-3 MK) a statínov, používaných v liečbe dyslipidémií. Mechanizmy podieľajúce sa na antiarytmických účinkoch omega-3 MK, a menej v prípade statínov, nie sú dostatočne objasnené.

Cieľ práce

Zaujíma nás preto, či tieto látky ovplyvnia medzibunkovú komunikáciu v srdci a v aorte hereditárne hypertriacylglycerolemických (HTG) potkanov. Tento experimentálny model imituje hypertriacylglycerolémiu u ľudí. Vystihuje ho remodelovanie ciev a endotelová dysfunkcia a iné abnormity (6), aj zvýšená náchylnosť srdca ku komorovej fibrilácii (7).

Materiál a metódy

Pre experimenty sme použili 3-mesačné samce HTG potkanov (n=18) a rovnako staré samce kontrolných potkanov kmeňa Wistar (n=18). Potkany sa rozdelili do 6 skupín: 1)

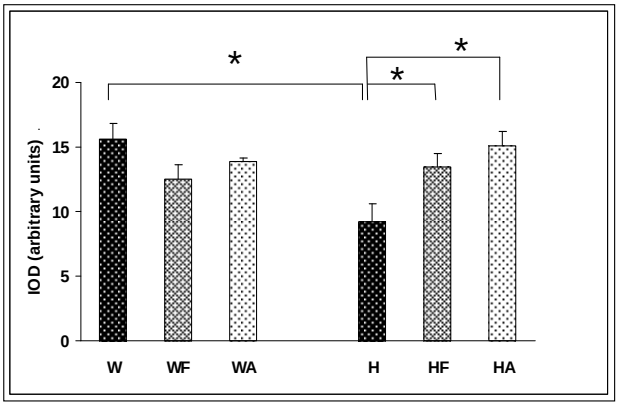
Wistar (n=6) na štandardnej strave; 2) Wistar (n=6) kŕmené omega-3 MK (Vesteralens, Nórsko, 30mg.kg–1 denne počas 2 mesiacov); 3) Wistar (n=6) s perorálnou aplikáciou Atorvastatínu (Zentiva, SK, 0.5mg.kg -1 denne počas 2 mesiacov); 4) HTG (n=6) na štandardnej strave; 5) HTG (n=6) kŕmené omega-3 MK (Vesterlaens, Nórsko, 30mg.kg-1 denne počas 2 mesiacov); 6) HTG (n=6) s perorálnou aplikáciou Atorvastatínu (Zentiva, SK, 0.5mg.kg-1 denne počas 2 mesiacov). Na konci pokusu sme potkany odvážili, merali sme im tlak krvi, stanovili hladinu sérového cholesterolu a triacylglycerolov. Potkanom v anestézii sme po otvorení hrudníka rýchlo odobrali srdce a aortu do ľadového fyziologického roztoku. Následne sme odvážili celé srdce a ľavú komoru. Jej strednú časť sme zmrazili v tekutom N2. Hrudnú aortu sme po izolácii zmrazili tiež. Odobraté vzorky sme skladovali v mraziacom boxe pri -75ºC. Z nich sme v kryostate pri -20ºC narezali 10 µm rezy (n=30 z každého srdca a z každej aorty). Na imunodetekciu sme použili myšie monoklonálne anti-Cx43 protilátky (Chemicon, USA) v prvej vrstve. V druhej vrstve sme aplikovali kozie anti-myšie protilátky konjugované s FITC. Imunofluorescenčný signál a digitalizované mikroskopické obrazy (n=20 per srdce a aorta) sme použili pre vizuálne hodnotenie intenzity a topológie Cx43 pozitívnych komunikačných spojení v aorte a v srdci, a pre kvantitatívnu analýzu (GmbH system, Germany). Štatistickú významnosť získaných hodnôt sme hodnotili studentovým t-testom.

Výsledky

Hladina cholesterolu v sére HTG potkanov sa nelíšila od Wistar. Liečenie ju neovplyvnilo na rozdiel od triacylglycerolov, ktoré boli u HTG potkanov zvýšené o 60%. Omega-3 MK a Atorvastatín ich významne znížili o 15, resp. 20%. Liečenie normalizovalo zvýšený systolický tlak krvi u HTG potkanov. Váha potkanov, srdca a ľavej komory sa po aplikácii látok významne nemenila.

Imunofluorescenčná detekcia odhalila zmenu v topológii Cx43 pozitívnych komunikačných spojení v myokarde ľavej komory HTG potkanov. V porovnaní s potkanmi Wistar sa imunopozitivita Cx43 v kardiomyocytoch vyskytovala vo väčšej miere v laterálne lokalizovaných komunikačných spojeniach. Okrem toho, kardiomyocyty v oblastiach poškodených fibrózou mali výrazne abnormnú distribúciu Cx43. Aplikácia omega-3 MK a Atorvastatínu neeliminovala uvedené abnormity v lokalizácii Cx43. Kvantitatívnou analýzou sme zistili významne zníženú expresiu Cx43 v myokarde ľavej komory HTG potkanov v porovnaní s Wistar. Aplikácia Atorvastatínu a omega-3 MK však intenzitu imunofluorescencie Cx43 významne zvyšovali, indikujúc jeho zvýšenú expresiu (Obr. 1).

V endoteli a v hladkom svale aorty HTG potkanov sme výraznejšie zmeny v distribúcii Cx43 pozitívnych komunikačných spojení nepozorovali. Semikvantitatívna analýza imunofluorescenčného signálu však poukázala na intenzívnejšiu imunoreaktivitu v médii a redukovanú imunoreaktivitu v endoteli aorty HTG potkanov v porovnaní s Wistar. Aplikácia Atorvastatínu aj omega-3 MK normalizovala tieto abnormity. Výsledky sme podrobnejšie opísali v inej práci (8).



Obr. 1. Expresia Cx-43 v ľavej komore srdca v neliečených Wistar (W) a HTG (H) potkanoch a po liečení omega-3 MK (F) a Atorvastatínom (A).

Diskusia

Originálne výsledky štúdie poukazujú na to, že metabolická porucha, akou je zvýšenie hladín plazmatických triacylglycerolov, sprevádzajú zmeny expresie aj distribúcie proteínu medzibunkových komunikačných kanálov, Cx43, v aorte a v srdci experimentálnych potkanov. Nemenej dôležité sú zistenia, že dvojmesačná aplikácia Atorvastatínu (inhibítora kľúčového enzýmu v syntéze cholesterolu), podobne ako suplementácia omega-3 MK (ovplyvňujú lipidový profil plazmy a biologických membrán), má za následok zvýšenie expresie Cx43 v endoteli aorty a v myokarde. To naznačuje, že obe testované látky veľmi pravdepodobne zlepšujú narušenú medzibunkovú komunikáciu v aorte a v srdci potkanov s dyslipidémiou.

Zníženie expresie Cx43 v endoteli aorty u HTG potkanov indikuje možné zhoršenie medzibunkovej komunikácie, ktoré by mohlo prispievať k endotelovej dysfunkcii, ktorú statíny čiastočne eliminujú (6). Zvýšená expresia Cx43 v bunkách hladkej svaloviny médie veľmi pravdepodobne súvisí s remodeláciou v stene aorty, ktorá sa liečením potlačí (9).

Okrem zmien v aorte, hypertriacylglycerolémiu sprevádza aj zmena topológie komunikačných spojení v myokarde ľavej komory a znížená expresia Cx43. Také zmeny veľmi pravdepodobne narušujú rýchly a kontinuálny prenos elektrického vzruchu, aj elektrickú stabilitu srdcového svalu (2,3,7). Tým sa zvyšuje náchylnosť srdca na vznik malígnej arytmie, ktorú u HTG potkanov dokumentujú (7). V protiklade s uvedeným, zvýšenie expresie Cx43 a predpokladané následné zlepšenie priamej medzibunkovej komunikácie po aplikácii oboch testovaných látok je v súlade s poklesom výskytu indukovateľnej fibrilácie komôr (10). Pozoruhodné je, že antifibrilačné účinky testovaných látok sa prejavili aj napriek tomu, že ani Atorvastatín,

ani omega-3 MK neeliminovali abnormity v topológii komunikačných spojení. Je preto možné špekulovať o tom, že ide skôr o abnormity v expresii Cx43, ktoré determinujú riziko výskytu letálnych arytmií.

Závery

Omega-3 MK a Atorvastatín zlepšujú narušenú medzibunkovú komunikáciu v aorte a v myokarde ľavej komory HTG potkanov. Domnievame sa, že tieto účinky môžu súvisieť s pleiotropnými účinkami statínov a antiarytmickými účinkami oboch testovaných látok.

Štúdiu podporili grant APVV 51-059505 a VEGA .

Použitá literatúra

1. Page E. Cardiac gap junctions. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, et al., editors. The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press; 1992; pp. 1003-1048.
2. Salameh A, Dhein S. Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? Biochimica et Biophysica Acta 2005; 1719: 36-58.
3. Tribulová N, Okruhlicová Ľ, Varon D, Manoach M, Pecháňová O, Bernátová I, Weismann P, Barančík M, Styk J, Slezák. Structural substrates involved in the development of severe arrhythmias in hypertensive rat and aged guinea pig hearts. In: Cardiac Remodeling and Failure, Eds. NS Dhalla, P Singal, Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 2002; p. 377-398.
4. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E in 11,324 Patients with Myocardial Infarction: Results of the GISSI-Prevenzione Trial, Lancet 1999 354, 447–455.
5. Mitchell LB, Powell JL, Gillis AM, Kehl V, Hallstrom AF, AVID Investigators. Are lipid-lowering drugs also antiarrhythmic drugs? An analysis of the antiarrhythmics versus implantable defibrillators (AVID) trial. JACC 2003; 42 (1): 81-87.
6. Zicha J, Pechanova O, Cacanyiova S, Cebova M, Kristek F, Torok J, Simko F, Dobesova Z, Kunes J. Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? Physiol Res 2006; 55(Suppl1) S49-S63,.
7. Tribulova N, Fialova M, Dlugosova K, Knezl V, Okruhlicova L, Kristek F, Zicha J, Kunes J. Myocardial gap junction remodelling in hypertriglyceridemic rat heart is associated with increased vulnerability to ventricular fibrillation. Cardiology 2006, 15 (Suppl. 1), p.32S.

8. Kolenová L, Dlugošová K, Weismann P, Jakubovský J, Navarová J, Slezák J, Tribulová N. Anti-fibrillating effects of hypolipidemic compounds is linked with upregulation of myocardial connexin-43. In: Tribulová N, Okuhlicová Ľ, Slezák J, eds. Proceedings of experimental approaches in basic research and diagnostic of diseases: Tailoring the treatment. Bratislava 2008, 145-158.

9. Kristek F, Edelsteinová S, Seboková E, Kyselovič J, Klimeš I. Structural changes in the aorta of the hereditary hypertriglyceridemic rat. Ann. N Y Acad. Sci. 1997; 827: 514-520.

10. Knezl V, Dřímal J, Tribulová N. Atorvastatin and omega-3 fatty acids decrease the incidence of lethal arrhythmias in rats with arrhythmogenic structural substrate. In: Tribulová N, Okuhlicová Ľ, Slezák J, eds. Proceedings of experimental approaches in basic research and diagnostic of diseases: Tailoring the treatment. Bratislava 2008, 159-169.

Testování inhibičního potenciálu reaktivátorů acetylcholinesterasy *in vitro*

Vendula Šepsová

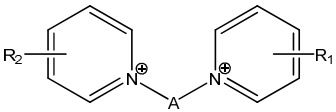
Spoluautoři: Ing.Kamil Kuča, PhD.[2]; Mgr. Markéta Komloová[3]
Školitel: PharmDr. Jana Žďárová Karasová[1]
[1]Katedra toxikologie a [2]Centrum pokročilých studií, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzita Obrany v Brně, [3]Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Úvod

Acetylcholinesterasa (AChE; 3.1.1.7) je tělu vlastní enzym, jehož hlavní rolí v organismu je štěpení neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) v synaptických štěrbinách mezi dvěma neurony, nebo na nervosvalové ploténce. Je-li tento enzym inhibován, dochází k nárůstu hladiny ACh a hyperstimulaci acetylcholinergních receptorů (1). Nejdůležitějšími inhibitory tohoto enzymu jsou organofosforové inhibitory (OFI). OFI jsou používány v zemědělství jako účinné pesticidy. Podle světové zdravotnické organizace je ročně intoxikováno přes 1 milion lidí a na následky těchto intoxikací pak umírá až 1/5 pacientů (2).

Terapie intoxikace OFI není v současnosti uspokojivě vyřešena. Doporučuje se podání kombinace anticholinergik (atropin, benaktyzin) a oximových reaktivátorů AChE (pralidoxim, případně obidoxim). Terapeutický efekt anticholinergik spočívá v obsazení cholinergních receptorů a tím zabránění jejich další aktivaci. Tato léčiva však nemají vliv na hladinu ACh. Kauzálními antidoty jsou reaktivátory AChE též označované jako oximy. Oximy působí jako nukleofilní činidla a jsou schopna defosforylovat inhibovanou AChE a tím obnovit její původní činnost (3,4).

Obr. 1: Obecná struktura biskvarterního reaktivátoru AChE:



R_1, R_2 : -CH=NOH
-$CONH_2$

A : -$(CH_2)_{1-12}$-
-CH_2OCH_2-
-$CH_2CH=CHCH_2$-

Oximy mimo svůj reaktivační účinek jsou také schopny AChE inhibovat. Jejich inhibiční účinek vychází ze samotné podstaty jejich reaktivačního účinku. Aby se mohly dostat do kavity enzymu a odštěpit z jeho aktivního místa inhibitor, musí samy

vykazovat afinitu k tomuto aktivnímu místu. Reaktivátory AChE na rozdíl od OFI nevytvářejí s AChE kovalentní vazbu – jsou to tzv. reverzibilní inhibitory AChE.

Cílem této práce bylo zjistit, jak struktura reaktivátoru ovlivňuje jeho inhibiční účinek na AChE. Do testů bylo zařazeno 30 reaktivátorů AChE lišících se ve spojovacím řetězci mezi dvěmi pyridinovými jádry či polohou oximových skupin. Tyto znalosti mohou být využity pro syntézu nových inhibitorů, jež mohou být využity k profylaxi otrav OFI, či v léčbě myastenie gravis.

Metodika

Pro stanovení inhibičních potenciálů jednotlivých reaktivátorů byla použita standardní Ellmanova metoda. Princip této metody je založen na schopnosti AChE rozkládat ne tělu vlastní substrát, acetylthiocholin. Vzniknuvší thiocholin pak reaguje s 5,5´- dithiobis(2-nitrobenzoovou) kyselinou (DTNB) za vzniku chromoforu, který je fotometrován při vlnové délce odpovídající 412 nm (5).

Do studie bylo zařazeno 30 testovaných reaktivátorů AChE, některé z nich jsou standardně používány v terapii intoxikace OFI (pralidoxim, obidoxim, HI-6), ostatní jsou nově syntetizovány na katedře toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví. Za použití Ellmanovy metody byly měřeny in vitro hodnoty IC50 skupiny 30 reaktivátorů AChE.

Do kyvety bylo napipetováno 90µl roztoku úhoří AChE, aktivita enzymu byla předem nastavena. K enzymu bylo po minutě přidáno 10µl zvoleného reaktivátoru o dané koncentraci (od 10-1 do 10-8 mM/l) a tato směs se nechala 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté bylo do kyvety přidáno 200µl DTNB, 600µl 0,1M fosfátového pufru o pH 7.4 a na závěr 100µl acetylthiocholinu. Vše bylo důkladně promícháno a poté byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru (Helios alpha; Electroncorporation, Velká Británie).

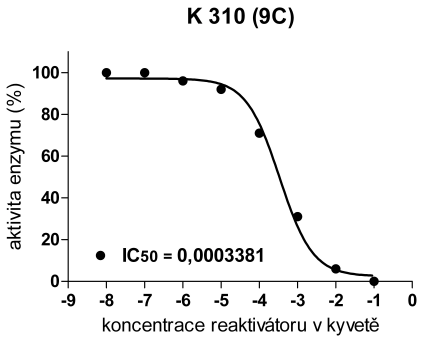
Oximy ve vyšších koncentracích štěpí DTNB. Abychom předešli falešně pozitivním výsledkům, byla provedena a změřena tzv. oximolýza ve slepých vzorcích. Do kyvety byla napipetována destilovaná voda místo roztoku úhoří AChE, byl přidán reaktivátor o dané koncentraci (od 10-1 do 10-8 mM/l). Po promíchání a přidání dalších roztoků byla změřena absorbance. Hodnota oximolýzy byla následně odečtena od dříve naměřené absorbance roztoku s enzymem v příslušné koncentraci oximu.

Ke každé koncentrační řadě byla navíc změřena aktuální aktivita enzymu (reaktivátor byl nahrazen destilovanou vodou o shodném objemu 10 µl).

Výsledky

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1, kde jsou uvedeny příslušné hodnoty IC50 jednotlivých oximových reaktivátorů AChE. Vzorová sigmoidální inhibiční křivka získaná u všech reaktivátorů AChE je znázorněna na obrázku 2.

Obr. 2: Inhibice AChE reaktivátorem K310.



Tab. 1: Hodnoty IC50 testovaných reaktivátorů AChE

Počet uhlíků ve spojovacím řetězci	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
IC50	0,2274	0,1246	0,05196	0,00427	0,00093	0,00097	0,00076	0,00037	0,00034	0,00016	0,00042	0,00046
Polohy oximových sk. - spoj. řetězec 4C	**2-2**	**3-3**	**4-4**							biskvarterní reaktivátor		
IC50	0,00106	0,00477	0,00427									
Polohy oximových sk. - spoj. řetězec 3C	**2-2**	**3-3**	**4-4**	**2-3**	**2-4**	**3-4**				biskvarterní reaktivátor		
IC50	0,00422	0,0195	0,05196	0,0177	0,00311	0,0138						
Změna polohy oximové skupiny na jádře	**2**	**3**	**4**							monokvarterní reaktivátor		
IC50	0,05489	0,02706	0,06431									
Změny spoj. řetězce - substituenty	**C-C-C**	**C-O-C**	**C-C-C-C**	**C-C=C-C**								
IC50	0,05196	0,03671	0,00427	0,00669								

Diskuze

Reaktivátory AChE, které jsou jako kauzální antidota používána v terapii intoxikací způsobených OFI, jsou zároveň reverzibilními inhibitory tohoto enzymu. Toto bylo potvrzeno v průběhu řešení této studie. Zároveň však byla sledována závislost mezi chemickou strukturou oximového reaktivátoru a jeho schopnosti inhibovat AChE.

Nejdůležitějším strukturálním rysem, který ovlivňuje afinitu oximu k aktivnímu místu enzymu je kvarterní dusík. Dalším strukturálním rysem, který výrazně ovlivňuje inhibiční potenciál AChE reaktivátorů je spojovací řetězec mezi dvěma pyridinovými jádry. S rostoucím počtem uhlíků ve spojovacím řetězci roste také jejich inhibiční účinnost, maxima pak dosahují reaktivátory s řetězcem dlouhým 9 – 10 uhlíků. S dalším prodloužením pak již schopnost inhibovat klesá. Zavedení substituentů, či dvojné vazby do struktury AChE reaktivátoru má také parciální vliv na jeho inhibiční potenciál. Reaktivátory, které jsou zavedeny v mnoha státech jako antidota vůči OFI intoxikacím mají krátký spojovací řetězec, převážně C3 – C4. Tyto reaktivátory mají velmi nízký inhibiční potenciál.

Dalším parametr, který byl v této studii sledován byl změna pozice oximových skupin na pyridinových jádrech AChE reaktivátoru. Nejvyšší inhibiční účinek mají biskvarterní reaktivátory se substituenty v polohách ortho, nejnižší pak se substituenty v polohách para.

AChE reaktivátory mají charakteristickou strukturu, která určuje nejen jejich reaktivační účinnost, ale zároveň velmi výrazně ovlivňuje farmakokinetiku těchto látek. Oximy nejsou schopny penetrovat ve vyšší míře přes hematoencefalickou bariéru, působí tedy převážně na periferii (6).

Vztahy sledované v této studii, mezi strukturou a inhibiční účinností, mohou být dále využity při navrhování struktur nových periferně působících inhibitorů AChE s reverzibilním účinkem. Mechanismu periferní inhibice AChE se využívá při profylaxi otrav nervově paralytických látek, terapii myasthenie gravis nebo například v anestetické praxi k zvratu působení podaných myorelaxancií (7), kde je zvýšení koncentrace ACh na synapsi žádoucí pro obnovení fyziologické funkce svalu (8). Látky používané v praxi se vyznačují zvýšeným výskytem nežádoucích účinků a hledání nových inhibitorů je proto stále aktuálním tématem.

Tato práci vznikla za finanční podpory Ministerstva obrany České Republiky, grant No. OPUOFVZ200805.

Použitá literatura

1. Jokanovic M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. Toxicol Lett 2009; 190: 107-115.

2. Yanagisawa N, Morita H, Nakajima T. Sarin experiences in Japan: acute toxicity and long-term effects. J Neurol Sci 2006; 249: 76-85.

3. Karasova JZ, Kassa J, Musilek K, Pohanka M, Novotny L, Kuca K. Effect of seven newly synthesized and currently available oxime cholinesterase reactivators on cyclosarin-intoxicated rats. Int J Mol Sci 2009; 10: 3065-3075.

4. Antonijevic B, Stojilkovic MP. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. Clin Med Res 2007; 5: 71-82.

5. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7: 88-95.

6. Karasova JZ, Stodulka P, Pohanka M, Kuca K. In vitro Screening of Blood-Brain Barrier Penetration of Monoquaternary Acetylcholinesterase Reactivators. Anal Lett 2009; In press.

7. Brufani M, Filocam L, Lappa S, Maggi A. New acetylcholinesterase inhibitors. Drugs Future 1997; 22: 397-411.

8. Palin R, Clark JK. Novel Piperidinium and Pyridinium Agents as Water-Soluble Acetylcholinesterase Inhibitors for the Reversal of Neuromuscular Blockade. Bioorg Med Chem Lett 2002; 12: 2569–2572.

Vliv narušené zubní estetiky na vnímání atraktivity úsměvu mezi zubními lékaři, ortodontisty a laiky

Veronika Cahová

Spoluautori: Jakub Kašpar, Yvona Tichá, Kateřina Strnadová
Školitelia: Doc. MUDr. Miloš Špidlen PhD.
Klinika zubního lékařství LF UP v Olomouci

Úvod

Chrup v současnosti plní kromě mastikační a fonační fuknce především funkci sociální a estetickou. Hodnocení estetiky a atraktivity chrupu je však do jisté míry individuální a může být zdrojem nedorozumění mezi pacientem a ošetřujícím lékařem.

Cílem této studie bylo proto posoudit vliv vybraných odchylek v postavení zubů na vnímání atraktivity úsměvu jako celku z pohledu odborné a laické veřejnosti. Hodnoceny byly tyto vybrané odchylky: posun střední čáry, sklon okluzní roviny, tvar okluzní roviny ve frontálním úseku (křivka řezacích hran horních řezáků, špičáků, premolárů a molárů) a viditelnost horních středních řezáků při úsměvu.

Metodika

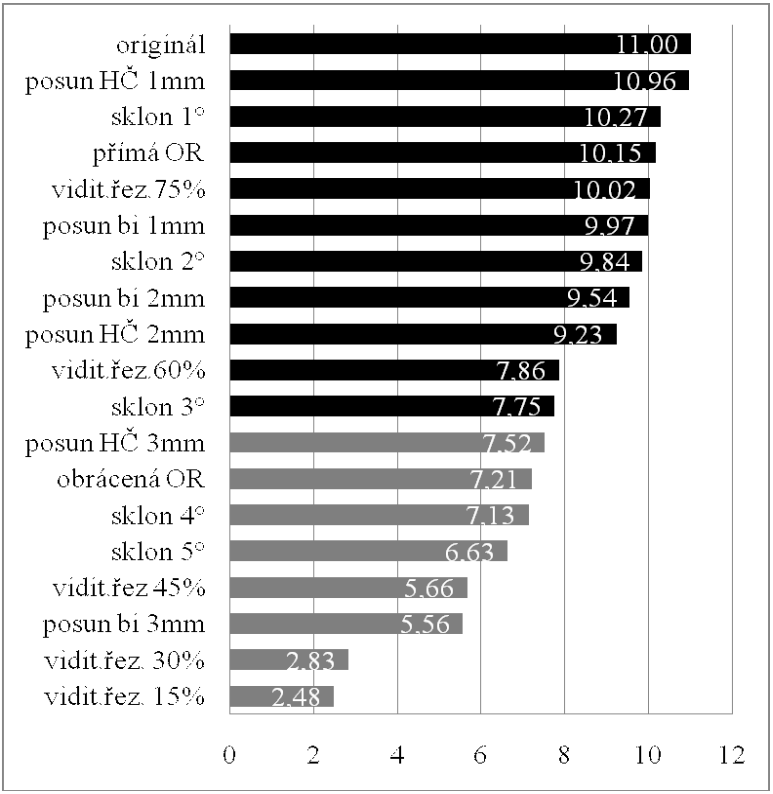
Digitální fotografie obličeje 23leté ženy při socialním úsměvu byla upravována v počítačovém programu Adobe Photoshop CS4. Bylo vytvořeno 19 fotografií o rozměru 400x500 pixelů s těmito úpravami: horizontální posun střední čáry horního zubního oblouku (o 1mm, 2mm, 3mm), horizontální posun střední čáry obou zubních oblouků (o 1mm, 2mm, 3mm), sklon okluzní roviny (1-5°), tvar linie okluzní roviny vůči linii tvaru linie dolního rtu (přímý, obrácený), viditelnost horních středních řezáků při úsměvu (15%, 30%, 45%, 60%, 75%, 100%)

Fotografie byly náhodně rozděleny do 5 sad, každá z nich obsahovala 6 fotografií a byly umístěny na webové stránky, které byly distribuovány mezi 4 skupiny respondentů – zubní lékaře, ortodontisty, studenty zubního lékařství a laiky. Do průzkumu se zapojilo celkem 554 osob.

Hodnocení respondenty spočívalo ve vyznačení míry atraktivity každého z úsměvu na stupnici od 1 do 15 (čím vyšší číslo, tím byl úsměv pro respondenta esteticky atraktivnější). Součástí webu byl rovněž dotazník, ve kterém hodnotitelé uvedli svůj věk, pohlaví a odpověděli na několik dalších otázek, pomocí kterých byla posouzena role estetického úsměvu v jejich životě. Získaná data byla statisticky zpracována testem Kruskal-Wallis a Mann-Whitney.

Výsledky

1) Jako výrazně méně atraktivní byly posuzovány fotografie s celkovým hodnocením nižším než 7,50, což byla střední hodnota hodnotitelům nabízené škály. V souhrném celkovém hodnocení (viz graf č.1) získaly nejnižší hodnocení (nejméně aktraktivní) tyto vady: viditelnost řezáků 15% (hodnocení 2,48) , 30% (hodnocení 2,83) a 45% (hodnocení 5,66), posun obou střední čáry o 3mm horizontálně (hodnocení 7,52) obrácenou linii okluzní roviny a její sklon o 4° a 5°.



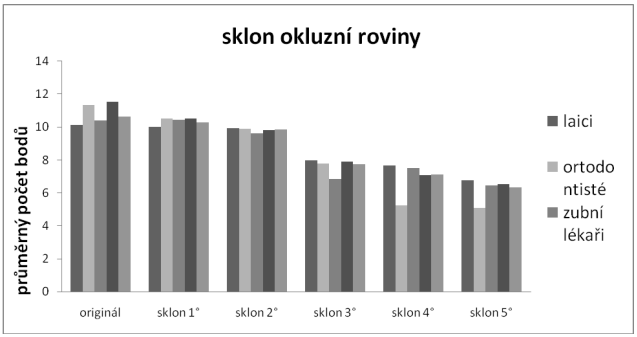
Graf č.1: Celkové hodnocení všech odchylek

2) Laici hodnotili obrácenou linii okluzni roviny průměrnou známkou 8,06 na rozdíl od ostatních skupin (průměr ostaních skupin hodnotitelů 6,09) viz tabulka č.1

Tabulka č.1: Průměrné hodnocení všech odchylek – skupina laiků

Laici	Průměr.hodnocení
vidit.řez.15%	2,81
vidit.řez.30%	2,96
vidit.řez.45%	5,86
posun bi 3mm	6,22
sklon 5°	7,30
sklon 4°	7,66
sklon 3°	7,98
posun HČ 3mm	8,00
obrácená OR	8,06
vidit.řež.60%	8,08
posun HČ 2mm	9,26
posun bi 2mm	9,66
vidit.řez.75%	9,81
posun bi 1mm	9,90
sklon 2°	9,92
sklon 1°	10,02
přímá OR	10,02
posun HČ 1mm	10,46
Originál	10,78

3) skupina ortodontistů hodnotila sklon okluz. roviny o 4° a 5° statisticky významně nižším počtem bodů (méně atraktivní) než ostatní skupiny



Graf č.2 – celkové zhodnocení vnímaní atraktivity úsměvu v závislosti na sklon okluzní roviny

Diskuze

Ve schopnosti posuzování atraktivity úsměvu nebyly mezi skupinami hodnotitelů překvapivě nalezeny významné rozdíly.

V hodnocení jednotlivých vad se skupiny přibližně shodovaly s výjimkou 2 případů.

Skupina laiků vnímala obrácenou linii okluzní roviny jako atraktivnější než ostatní skupiny. Tohoto poznatku můžeme využít při rozvaze o ošetření abrazivní defektů horních středních řezáků spojených se zkrácením klinické korunky.

Skupina ortodontistů považovala výrazný sklon okluzní roviny (4° a 5°) za méně atraktivní než ostatní skupiny hodnotitelů. Lze tedy usuzovat, že ortodontisté jsou k těmto typům asymetrických odchylek více vnímavější, ačkoliv pro další skupiny a to zejména laikům nepůsobí esteticky natolik rušivě, čehož lze využit při plánování ortodontické terapie.

Závěr

Mezi skupinami zubních lékařů a studentů zubního lékařství nebyly prokázány významné rozdíly ve vnímaní estetických odchylek. Za nejméně aktraktivní považovala většina zúčastněných hodnotitelů: viditelnost řezáků 15%, 30% a 45%, posun střední čáry o 3mm, horizontálně obrácenou linii okluzní roviny a její sklon o 4° a 5°. Skupina laiků vnímala obrácenou linii okluzní roviny jako atraktivnější než ostatní skupiny. Skupina ortodontistů považovala výrazný sklon okluzní roviny (4° a 5°) za méně atraktivní než ostatní skupiny.

Klinická sekcia

Odborná komisia

Predseda

prof. MUDr. Jan Trka, PhD.	Karlova univerzita, 2. LF, Praha, ČR

Členovia

doc. MUDr. Ján Staško, PhD.	Univerzita Komenského, LF Martin, SR
prof. MUDr. Anton Kohút, DrSc.	Univerzita P.J.Š., LF, Košice, SR
doc. MUDr. Jiří Kobr, PhD.	Karlova univerzita, LF, Plzeň, ČR
doc. MUDr. Ljuba Bachárová, CSc. MBA	Medzinárodné laserové centrum, Bratislava, SR

Pericentrická inverze chromozomu 9 – pouhá varianta?

Antonín Šípek

Školitelé: MUDr. Aleš Panczak, CSc., MUDr. Romana Mihalová
Ústav biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Úvod

Pericentrické inverze patří mezi strukturální chromozomální aberace. Jejich původ vysvětlujeme vznikem dvou zlomů na jednom chromozomu, otočením uvolněného fragmentu (který v tomto případě obsahuje centromeru) a jeho opětovným připojením v invertované pozici. Klinický a cytogenetický význam takovýchto přestaveb je různý - v závislosti na lokalizaci a rozsahu (1).

Pericentrické inverze chromozomu 9 (inv(9)) existují v několika variantách lišících se rozsahem. Nejčastěji jde o variantu inv(9)(p12q13) či inv(9)(p12q21). Invertovaná oblast je tvořena převážně heterochromatinem, proto převládá již delší dobu názor, že tyto přestavby nemají klinický význam a mají charakter polymorfizmu (2, 3). Odhady populační incidence inv(9) se pohybuje od 1 do 3 % (4).

Část autorů však zmiňuje možnou asociaci inv(9) s různými skupinami diagnóz - nejčastěji sterilitou či infertilitou (4, 5), schizofrenií (6, 7) nebo se zvýšeným rizikem narození potomka s Downovým syndromem (8, 9).

Metodika

Případy inv(9) byly vyhledány z cytogenetické dokumentace tří pražských pracovišť lékařské genetiky: Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (dále VFN), Oddělení lékařské genetiky Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou (FTN) a Sanatoria Pronatal (Pronatal).

Materiálem k cytogenetickému vyšetření byla periferní (vzácně fetální) krev, vlastní karyotypizace byla provedena téměř výhradně pomocí G pruhování. U každého případu s inv(9) byl zaznamenán karyotyp, pohlaví a indikační diagnóza (důvod vyšetření). Z těchto dat byla stanovena laboratorní incidence, spektrum indikačních diagnóz a poměr pohlaví v tomto souboru.

Populační incidenci jsme odhadli pomocí dvou specifických souborů pacientů, kteří nebyli vyšetřováni z důvodu podezření na určitou patologii: 1) dárci gamet ze Sanatoria

Pronatal; 2) děti určené k zařazení do programu Náhradní rodinné péče z FTN. Kontrolní soubor osob s normálním karyotypem byl vytvořen metodou náhodného výběru z dokumentace cytogenetické laboratoře VFN. V rámci dat z VFN jsme dále porovnali incidence jednotlivých diagnóz v souboru pacientů s inv(9) a v souboru kontrolním a výsledky statisticky vyhodnotili (Fischerův exaktní test).

Výsledky

Celkem jsme zachytili 351 případů inv(9) (tabulka 1). Za uvedená období bylo na zmíněných pracovištích provedeno celkem 21 944 cytogenetických vyšetření z periferní (fetální) krve. Celková laboratorní incidence byla 1,60 %. Ve všech laboratořích bylo v souboru pacientů s inv(9) vyšší zastoupení žen; celkový poměr pohlaví byl 1,29 ve prospěch žen.

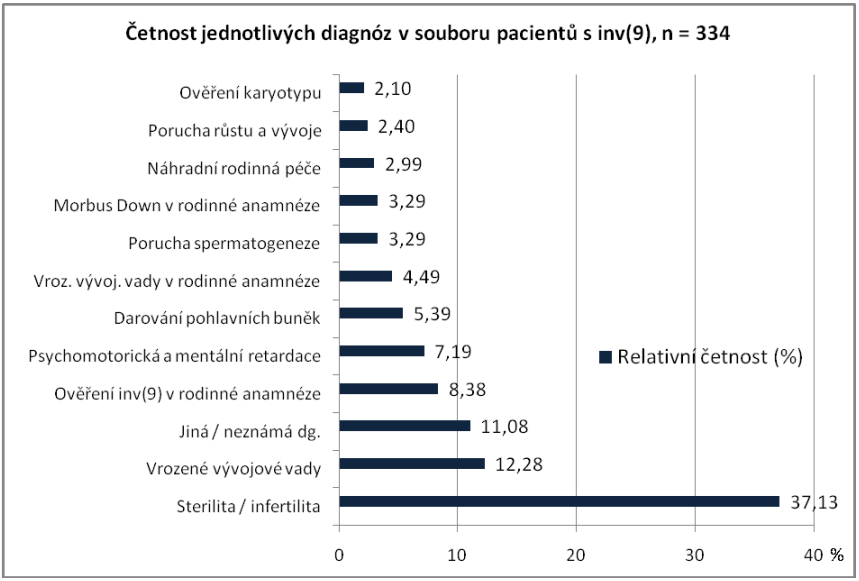
Tabulka 1 Počty případů, laboratorní incidence a poměr pohlaví – data za jednotlivá pracoviště a celková.

	VFN	FTN	Pronatal	celkem
Období	1986 - 2008	1981 - 2008	2002 - 2008	
Počty případů				
Případů inv(9)	148	125	78	351
Všechna vyšetření	9613	7884	4447	21944
Laboratorní incidence (%)				
Incidence inv(9)	1,54	1,59	1,75	1,60
Poměr pohlaví				
Muži (M) s inv(9)	60	61	32	153
Ženy (F) s inv(9)	88	64	46	198
Poměr F/M	1,47	1,05	1,44	1,29

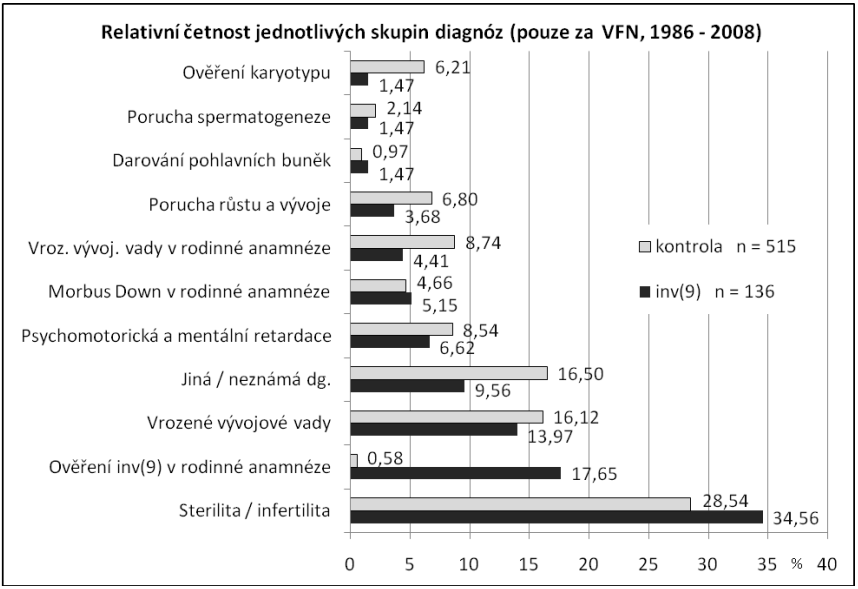
Pro hodnocení spektra indikačních diagnóz jsme z 351 případů inv(9) vyřadili 17 případů, u kterých byla současně přítomná chromozomální patologie. Zastoupení dvanácti hodnocených skupin indikačních diagnóz u zbylých 334 případů inv(9) ukazuje graf 1. Nejvíce zastoupenou skupinou byla sterilita/infertilita se 37,13 %.

V rámci dat z VFN bylo spektrum indikačních diagnóz poněkud odlišné, bylo zde například vysoké zastoupení skupiny – Ověření inv(9) v rodinné anamnéze – se 17,65 % (v rámci VFN se dlouhá léta nález této inverze u potomka ověřoval vyšetřením karyotypu obou rodičů). I v tomto souboru byla nejčastější skupinou diagnóz sterilita/infertilita s 34,56 %. Porovnáním incidencí indikačních diagnóz v souboru pacientů s inv(9) a v souboru kontrolním jsme identifikovali 4 skupiny indikačních diagnóz, které byly častější v souboru pacientů s inv(9) (viz graf 2).

Šlo o tyto skupiny diagnóz: 1) Darování pohlavních buněk (velmi malé absolutní počty, rozdíl nevýznamný), 2) Morbus Down v rodinné anamnéze (velmi malé absolutní počty, rozdíl nevýznamný), 3) Ověření inv(9) v rodinné anamnéze (rozdíl očekávaný a snadno vysvětlitelný) a 4) Sterilita/infertilita – zde byl rozdíl incidencí relativně velký, ovšem nebyl statisticky významný (p = 0,1726). Přesto jsme stanovili relativní riziko (RR): RR = 1,21 (95% konfidenční interval (CI) = 0,90 – 1,58).



Graf 1 Relativní četnost jednotlivých skupin indikačních diagnóz v celém souboru (n = 334)



Graf 2 Relativní četnost jednotlivých skupin indikačních diagnóz z dat VFN - porovnání souboru pacientů s inv(9) a souboru kontrolního.

Populační incidenci jsme odhadovali na dvou specifických souborech. Mezi 484 dárci pohlavních buněk jsme zachytili 7 případů této inverze (incidence = 1,45 %). Mezi 411 dětmi určenými k zařazení do programu Náhradní rodinné péče jsme zachytili 10 případů této inverze (incidence = 2,43 %).

Diskuse

Z dosud nasbíraných dat se nám nepodařilo prokázat významnou asociaci inv(9) s určitou diagnózou. Nyní sbíráme data i z dalších pracovišť a soubor tak neustále rozšiřujeme. Nicméně i současný rozsah souboru (n = 351) předčí soubory z dostupné literatury. Prokázali jsme vysoké zastoupení reprodukčních poruch – a to 37,13 % ze všech indikačních diagnóz. Podobné výsledky mají i zahraniční publikace (8, 9). Studie založené na datech z cytogenetické dokumentace bohužel nedokážou odfiltrovat případy sterility/infertility způsobené jinými mechanizmy (imunologické příčiny, mikrodelece chromozomu Y, nosičství genu CFTR a další - neznámé příčiny). Kauzální mechanizmus ovšem zůstává předmětem sporů. Klasický mechanizmus rekombinační aneuzomie (1) někteří autoři u inv(9) nepřipouštějí (3). Existují i názory, že v případě inv(9) nejde o klasickou inverzi, ale o polymorfizmus sekvencí heterochromatinu. Klinický význam inv(9) potom může být hodnocen spolu s dalšími variantami této

oblasti – např. 9qh+ či 9qh- (10). Existenci určité asociace inv(9) s reprodukčními poruchami nemůžeme vyloučit, proto význam inv(9) prozatím hodnotíme jako nejistý.

V našem souboru jsme neprokázali zvýšení rizika narození potomka s Downovým syndromem pro pacienty s inv(9). V této souvislosti se uvažuje o tzv. interchromozomálním efektu, o jehož existenci však někteří autoři pochybují (3). Ovšem existují studie, které u muže s inv(9) prokázaly významně vyšší zastoupení dizomických spermií (a to nejen pro chromozom 21) (10).

Nalezli jsme vyšší zastoupení žen v souboru osob s inv(9) (poměr F/M = 1,29). Vyšší zastoupení žen v této skupině popsaly i jiné studie (8).

U dětí určených k Náhradní rodinné péči, kde je karyotypizace standardní součástí celého postupu, jsme zachytili vyšší incidenci inv(9) než u dárců gamet. Dárce gamet je ovšem nutné považovat za skupinu, která prošla určitou selekcí (vyšetřovací protokol). Nicméně oba odhady spadají do rozmezí incidencí stanovených jinými autory a jinými metodami.

Použitá literatura

1. Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling, 3rd ed. Oxford; Oxford University Press, 2004, 577s.
2. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009: An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel; Karger, 2009, 138s.
3. Balíček P. Pericentrické inverze lidských chromozomů a jejich rizika. Čas Lék čes 2001; 140 (2): 38-42
4. Khaleghian M, Azimi C. Homozygosity for pericentric inversions of chromosome 9 in a patient's parents with stillbirth – Report of a new case and review of literature. Iranian J Publ Health 2006; 35 (3): 28-33
5. Uehara S, Akai Y, Takeyama Y, Takabayashi T, Okamura K., Yajima A. Pericentric inversion of chromosome 9 in prenatal diagnosis and infertility. Tohoku J Exp Med 1992; 166 (4): 417-427
6. Lee KB, Kunugi H, Nanko S. Familial schizophrenia with pericentric inversion of chromosome 9: a case report. Schizophr Res 1998; 32 (2): 123-126
7. Demirhan O, Taştemir D. Chromosome aberrations in a schizophrenia population. Schizophr Res 2003; 65 (1): 1-7
8. Demirhan O, Pazarbasi A, Suleymanova-Karahan D, Tanriverdi N, Kilinc Y.: Correlation of clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 and genetic counseling. Saudi Med J 2008; 29 (7): 946-951

9. Starke H, Seidel J, Henn W et al. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. Eur J Hum Genet 2002; 10 (12): 790-800

10. Amiel A, Sardos-Albertini, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. J Hum Genet 2001; 46 (5): 245-250

Rozvoj funkce transplantované ledviny u dětí ve vztahu k poměru hmotnosti dárce/příjemce (donor/recipient body masses ratio - D/R BMR)

Eva Foltynová

Spoluautoři: Tomáš Seeman [1, 2], Karel Matoušovic [1, 3]
Školitel: MUDr. Jaroslav Špatenka, CSc.[1]
[1]Transplantační centrum FN Motol, [2]Pediatrická klinika a [3] Interní klinika, Universita Karlova, 2. lékařská fakulta Praha, Česká republika.

Úvod

Při stáži na klinice dětské chirurgie jsem měla možnost se aktivně zúčastnit transplantace ledviny u malého dítěte. Poznala jsem, že se postup značně lišil od toho, co jsem věděla o transplantaci ledvin u dospělých. Školitel a spoluautoři mi poskytli literaturu a umožnili studovat na materiálu pracoviště jeden z typických pediatrických problémů při transplantaci ledvin u dětí.

Průměrná hmotnost ledviny novorozenců je 26.6 g, s věkem stoupá tak, že ve 20 letech dosahuje 269 g. Na vzestupu hmotnosti ledviny se podílí růst všech složek tkáně ledvin, např. šířka bazální membrány glomerulu se zvětšuje ze 150 nm při narození na 300 nm v pěti letech a až na 400 nm v dospělosti. Glomerulární filtrace (GFR) s růstem dítěte také narůstá. H. S. Mackensie a spol. (1994) ukázali v experimentu, že množství transplantované tkáně u krys významně ovlivňuje funkci a morfologii renálního štěpu (1, 2). Toto zjištění může být důležité především při transplantaci ledvin dětským příjemcům nízké hmotnosti, protože transplantační centra mají k dispozici především štěpy dospělých dárců (a některá centra štěpy dospělých ideálních dárců pro děti dokonce preferují). Předpokládali jsme, že objem transplantované renální tkáně může ovlivnit GFR v posttransplantačním období a tato hypotéza byla testována.

Metodika

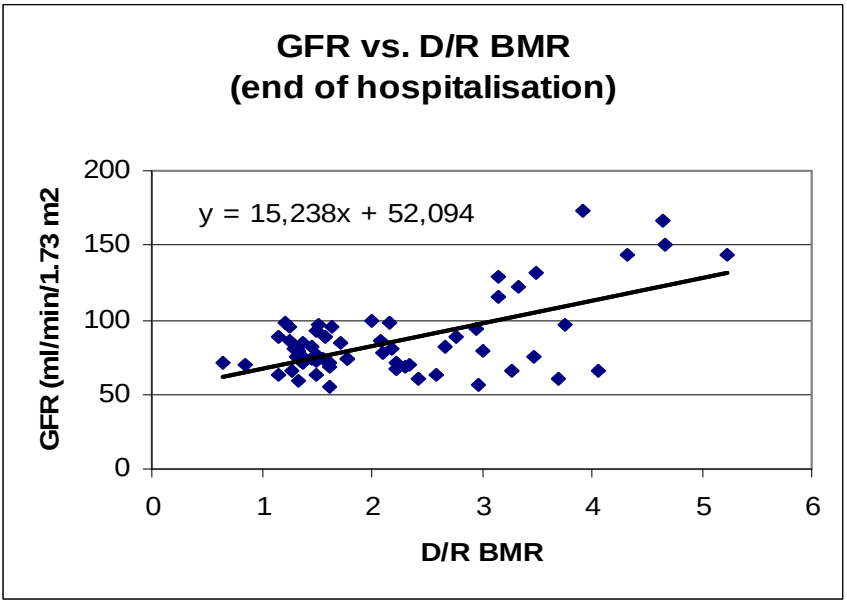
1997-2007 byla provedena transplantace ledviny konsekutivně 66 dětem ve věku 4 -19 let (průměr 12.5 ± 3.9), 36 z nich byli chlapci, 30 děvčata. Hmotnost příjemců v době transplantace se pohybovala v rozmezí 13 to 112 kg (průměr 39.37 ± 17.90). Čtyři transplantace byly od žijících, příbuzenských dárců a 62 od dárců kadaverózních. Věk žijících dárců byl 37 až 41 let, jejich tělesná hmotnost byla od 51 do 87 kg (70.5 ± 17.7). Věk kadaverózních dárců byl 11 až 52 let (30.85 ± 12.06), tělesná hmotnost dárců se pohybovala od 35 do 150 kg (průměr 71,91 ± 16,21). Děti byly sledovány 710 – 4448 dní (průměrně 2122 ± 878).

Retrospektivně jsme vyhodnotili hladiny sérového (S-cr), stanovené na ústavu biochemie a patobiochemie UK 2. lékařské fakulty Praha) a vypočítali jsme clearence kreatininu podle Schwartze při propuštění dítěte, po 12 měsících a na při poslední kontrole (= na konci sledování). Všechny výsledky byly korelovány s poměrem hmotnosti dárce a příjemce – byl spočítán index "donor/recipient body masses ratio" (D/R BMR).

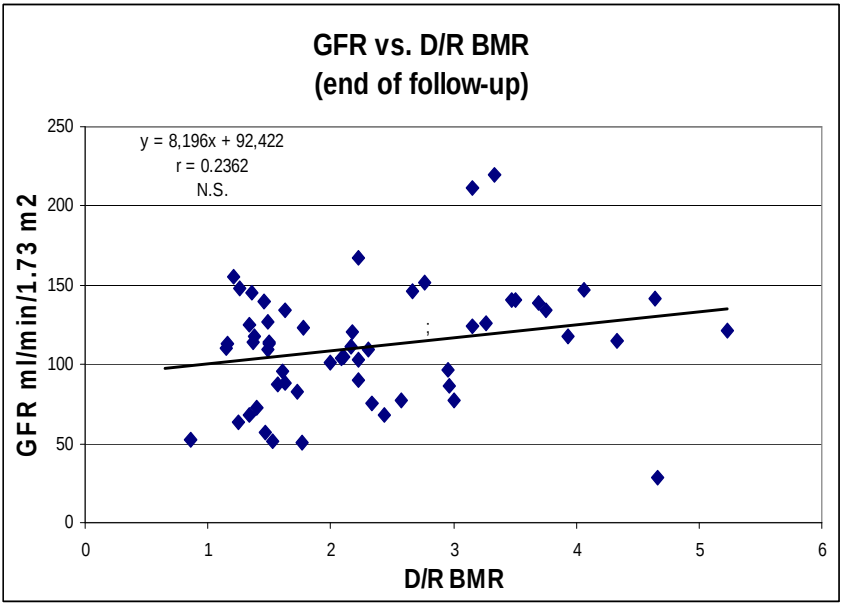
Výsledky

Scr významně přímo koreloval s D/R BMR při propuštění – graf 1 (r = 0.6125, P <0.01) a 1 rok po transplantaci - graf 2 (r = 0.5938, P), ale ne na konci sledování při poslední kontrole.

Graph 1:



Graph 2:



Diskuse

Objem, ani hmotnost renálního štěpu se běžně nezjišťuje. Předpokládali jsme ale, že u ideálních dárců (a český transplantační program dětským příjemcům alokuje pouze ideální dárce) narůstá objem renální tkáně úměrně s hmotností dárce. Významnost přímé korelace mezi D/R BMR při transplantaci a hladinou Scr se v pozdním posttransplantačním období snižuje. Možným vysvětlením je, že chronická rejekce postupně stírá původní jednoznačný vliv indexu D/R BMR při transplantaci na časnou funkci renálního štěpu.

Závěr

Prokázali jsme velmi významnou přímou korelaci mezi indexem D/R BMR při transplantaci a hladinou Scr časně a 1 rok po transplantaci. Později po transplantaci, tedy na konci sledování je tato funkční závislost méně významná (ale stale signifikantní).

Použitá literatura

1. Chertow GM, Milford EL, Mackenzie HS, Brenner BM. Antigen-independent determinants of cadaveric kidney transplant failure JAMA. 1996, 4:: 1732-1736.
2. Taal MW, Tilney NL, Brenner BM, Mackenzie HS. Renal mass: an important determinant of late allograft outcome. Transplant Rev 1998; 12:74-84.

Hypoglykémie na jednotce intenzivní metabolické péče FNKV: Výskyt, příčiny, léčení, výsledky u 100 pacientů

Josef Fontana

Spoluautor: Pavel Špás
Školitel: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.
Centrum výzkumu diabetu, metabolismu a výživy a II. Interní klinika FNKV, 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Úvod

Těžká hypoglykémie bez ošetření akutně ohrožuje pacienta na životě a představuje stav, jenž si velmi často vyžaduje nutnost léčení na jednotkách intenzivní péče. Proto jsme se rozhodli blíže retrospektivně analyzovat data o pacientech indikovaných k léčbě pro hypoglykémii na jednotce intenzivní metabolické péče II. interní kliniky fakultní nemocnice Královské Vinohrady z období let 2000 až 2008.

Cílem našeho sledování bylo identifikovat pacienty přijaté pro tak těžkou akutní hypoglykémii, že byli indikováni pro přijetí na JIMP, rozdělit je dle typu diabetu či dalšího onemocnění, zjistit nezbytnou délku hospitalizace na jednotce intenzivní péče, mortalitu a důležité komorbidity, které významně zhoršují prognózu. Získané výsledky jsme také srovnali s daty publikovanými v mezinárodním písemnictví.

Pacienti a metodika

Do studie byli zařazeni všichni nemocní přijatí s primární diagnózou hypoglykemický stav nebo hypoglykemické kóma, inkluzívním kritériem byla hodnota glykémie pod 3 mmol/l a současná potřeba intenzivní péče. Pacienti byli převážně přivezeni RZP, u některých z nich již po léčbě i.v. glukózou došlo k obnově vědomí. Exkluzivní kriteria nebyla.

Nemocných bylo celkem 100: 57 M, 43 Ž, průměrný věk 62 ± 19 let (průměr ± SD), 79 diabetiků a 21 nediabetiků. T2DM se vyskytoval u 51 pacientů (22 M, 29 Ž, průměrný věk byl 72 ± 11 let), samotným insulinem bylo léčeno 29 z 51 pacientů (nikdo na insulinové pumpě), pouze Sulfonylureou 9, pouze Metforminem 2, kombinací insulin + sulfonylurea 2, insulin + metformin 1, sulfonylurea + metformin 2 a trojkombinací insulin + sulfonylurea + metformin 1 pacient), T1DM nebo LADA typ diabetu mělo celkem 18 pacientů (16 M, 2 Ž, průměrný věk 41 ± 18 let), sekundárních diabetiků bylo 6 (4 M, 2 Ž, průměrný věk 49 ± 11 let) a pacientů bez diabetu bylo 21 (11 M, 10 Ž, průměrný věk 55 ± 21 let). U 4 pacientů nebyl uveden typ diabetu. Strukturu souboru uvádí tabulka č. 1.

Mezi pacienty s T2DM léčených metforminem se těžká hypoglykémie vyskytla 6x (1x v kombinaci metformin + insulin, 2x v kombinaci metformin + sulfonylurea, 1x v trojkombinaci metformin + sulfonyurea + insulin a 2x samotný metformin).

Všichni pacienti byli léčeni intravenózně podanou glukózou a v počátečních stádiích pobytu na intenzivní jednotce jim byla vysazena léčba insulinem nebo perorálními diabetiky.

Tabulka č. 1 – Struktura souboru pacientů

Charakteristika skupiny	Počet pacientů	Věk (průměr ± SD let)	Poměr Ž / M
Celý soubor	100	62 ± 19	43 / 57
Diabetici	79	64 ± 18	33 / 42
Nediabetici	21	55 ± 21	10 / 11
T1DM a LADA	18	41 ± 18	2 / 16
T2DM	51	72 ± 11	29 / 22
Sekundární DM	6	49 ± 11	2 / 4

Výsledky

Celkem zemřelo 15 pacientů (mortalita 15%), z toho 8 diabetiků a 7 nediabetiků. Ve skupině diabetiků byla mortalita přibližně 10% (zemřelo 8 ze 79 diabetiků). Ve skupině nediabetiků zemřelo 7 z 21 pacientů – mortalita 33,3%. Rozdíl v mortalitě na hypoglykémii u nediabetiků a u pacientů s diabetem je statisticky významný - 7/21 proti 8/79 ($p < 0, 01$). Zatímco mortalita ve skupině diabetiků dosahuje zhruba 10%, u pacientů bez známek diabetu je mortalita více než 3x vyšší.

V jednotlivých podskupinách diabetiků byla mortalita následující: Zemřel 1 pacient s T1DM (mortalita 5,5%), 6 pacientů s T2DM (mortalita 11,7%) a 1 sekundární diabetik (mortalita 16,6%).

Ve skupině diabetiků 2. typu se jaterní postižení (jaterní cirhóza, akutní jaterní selhání) vyskytlo u 11 pacientů. Z těchto 11 diabetiků 2. typu zemřeli 4 – mortalita v této podskupině je tedy 36,4%. 17 z 51 pacientů s T2DM trpělo závažnou infekcí či sepsí a v této podskupině zemřeli 3 pacienti – mortalita 17,6%.

Z 21 nediabetiků se vyskytla hypoglykémie u 12 pacientů se známkami těžké infekce nebo sepse a u 7 pacientů s jaterním postižením. Z 12 nediabetiků s těžkou infekcí zemřelo 6 pacientů – mortalita 50%. V podskupině nediabetiků s jaterním postižením zemřeli 4 ze 7, mortalita byla tedy 57% (všichni 4 zemřelí nediabetici s jaterním postižením měli též známky těžké infekce nebo sepse).

Průměrná doba hospitalizace pacientů na JIMP byla 10 dnů (medián byl 3 dny). Naše výsledky zachycuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2 – Mortalita a délka hospitalizace v jednotlivých podskupinách

Charakteristika skupiny	Mortalita ve skupině	Průměrná doba hospitalizace	Medián počtu dní hospitalizace
Celá soubor	15%	10 dnů	3 dny
Diabetici	10%	10,5 dne	3 dny
Nediabetici	33,3%	7,9 dnů	3 dny
T1DM a LADA	5,5%	5 dnů	3 dny
T2DM	11,7%	13,8 dnů	3 dny
Sekundární DM	16,6%	4,3 dny	2,5 dne
T2DM s postižením jater	36,4%	-	-
T2DM s těžkou infekcí	17,6%	-	-
Nediabetici s postižením jater	57%	-	-
Nediabetici s těžkou infekcí	50%	-	-

Výsledky jsme srovnali s výsledky publikovanými v posledních 25 letech a naše celková mortalita i mortalita u nediabetiků odpovídá datům publikovaným v mezinárodním písemnictví. Srovnání zachycuje tabulka č. 3.

Tabulka č. 3 – Srovnání našich výsledků s mezinárodními studiemi.

První autor práce	Rok	Celková mortalita	Mortalita u nediabetiků
Fischer KF (1)	1986	27%	-
Cruz Jentoft AJ (2)	1992	25%	-
Stagrano-Green A (3)	1995	22,2%	-
Shilo S (4)	1998	-	48%
Mendoza A (5)	2005	-	16%
Mannucci E (6)	2006	-	41,4%
Naše výsledky	2009	15%	33,3%

Diskuse

Uzavíráme, že těžká hypoglykémie vždy představuje závažný stav spojený s rizikem úmrtí, které je asi 10% u pacientů s diabetem. Trojnásobně vyšší mortalitou jsou stiženi

nediabetici s hypoglykémií. Velmi vysoká mortalita ve skupině nediabetiků s jaterním postižením (57%) a těžkou infekcí (50%) svědčí pro to, že se u našich pacientů jedná o těžký terminální stav spojený s poruchou produkce glukózy.

Použitá literatura

1. KF Fischer, JA Lees, Newman JH. Hypoglycemia in hospitalized patients: Causes and outcomes. N Engl J Med, 1986 Nov 13;315(20): 1245-50, St. Louis
2. Cruz Jentoft AJ, Villar I, Carreras P, Ribera JM. Unexpected hypoglycemia in hospitalized patients. Rev Clin Esp 1992 Oct;191(6): 295-8, Madrid
3. Stagnaro-Green A, Barton MK, Linekin PL Corkery E, deBeer K, Roman SH. Mortality in hospitalized patients with hypoglycemia and severe hyperglycemia. Mt Sinai J Med, 1995 Nov;62(6): 422-6, New York
4. Shilo S, Berezovsky S, Friedlander, Sonnenblick M. Hypoglycemia in hospitalized nondiabetic older patients. J Am Geriatr Soc. 1998 Aug;46(8): 978-82. Jerusalem
5. Mendoza A, Kim YN, Chernoff A. Hypoglycemia in hospitalized adult patients without diabetes. Endocr Pract. 2005 Mar-Apr;11(2): 91-6. Philadelphia
6. Mannucci E, Monami M, Mannucci M a spol. Incidence and prognostic significance of hypoglycemia in hospitalized non-diabetic elderly patients. Aging Clin Exp Res. 2006 Oct;18(5): 446-51. Florence

Mortalita nemocných s chronickým srdečním selháním sledovaných ve specializované ambulanci

Lujza Galková

Spoluautoři: Martina Šablaturová, Zdeňka Gregorová
Školitelé: MUDr.Ondřej Ludka, PhD., prof. MUDr. Jindřich Špinar, CSc.
Interní kardiologická klinika - Společná pracoviště s Fakultní nemocnicí Brno - pracoviště medicíny dospělého věku - Lékařská fakulta

Úvod

Chronické srdeční selhání je velmi různorodé onemocnění. Tato heterogenita souvisí především s různou etiologií vzniku, různým klinickým průběhem a také různou reakcí pacientů na danou léčbu. Příčiny vzniku CHSS se v průběhu let mění. V 50. letech minulého století byly hlavními viníky hypertenze a postrevmatické chlopenní srdeční vady, především mitrální stenóza. V dnešní době díky moderním operačním postupům a účinné léčbě hypertenze se hlavní příčinou stávají ischemická choroba srdeční, spojená s životním stylem a prodlužováním délky života, a dilatační kardiopatie. Prevalence chronického srdečního selhání se v evropských zemích pohybuje mezi 0,4 až 2 %, v konkrétních údajích pro Českou republiku to znamená 40 až 200 tisíc nemocných. Ročně prodělá infarkt myokardu asi 45 000 pacientů, z toho 7 % umírá na akutní srdeční selhání a asi u 20 % přeživších se do roka rozvine chronické srdeční selhání. Prognóza chronického srdečního selhání je velmi špatná. Framinghamská studie prokázala, že do pěti let od vzniku klinických příznaků srdeční nedostatečnosti umírá více než 50 % nemocných a do jednoho roku přibližně 17 % nemocných.

Léčba chronického srdečního selhání je do jisté míry standardizována. Jako nejvhodnější farmakologická terapie bylo prokázáno užití ACE inhibitorů, β blokátorů, inhibitorů receptorů pro angiotenzin II, diuretik a kardiotonik. I přes terapeutický přínos nových léčiv se dostáváme do obtíží hlavně u pacientů, u kterých dojde k dekompenzaci již léčeného chorobného stavu. Můžeme zvýšit dávku podávaných léčiv, to platí především u diuretik. Při zvýšení dávkování ACE inhibitorů či β blokátorů může dojít k prohloubení již přítomné hypotenze. Navýšení dávek kardiotonik je také sporné. V léčbě srdečního selhání se tedy na prvním místě uplatňuje léčba symptomatická, protože žádné z nabízených léčiv není schopné zvrátit progredující průběh této závažné choroby.

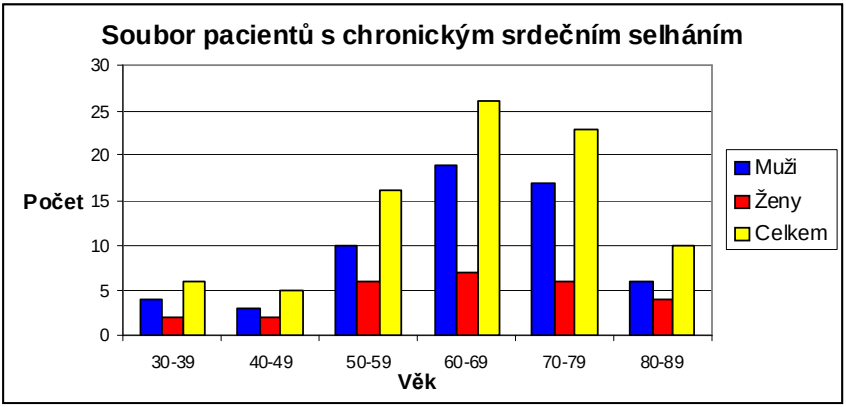
Metodika

Naše práce se zakládá na retrospektivním sběru dat za roky 2004 až 2009, které jsme statisticky vyhodnotili. K získání potřebných údajů jsme využívali záznamy z ambulance pro chronické srdeční selhání.

Výsledky

Naším cílem je zjistit mortalitu nemocných s chronickým srdečním selháním sledovaných v ambulanci srdečního selhání ve Fakultní nemocnici Brno. Databáze nám poskytla informace o příčinách vzniku onemocnění, výchozím stavu pacientů, průběhu léčby a dalších onemocněních, které mohou ovlivňovat průběh chronického srdečního selhání (diabetes, chronická obstrukční plicní nemoc,…). Tyto výsledky srovnáváme s podobnými studiemi a můžeme usuzovat, zda došlo v průběhu let ke zlepšení prognózy pacientů. Nejvýznamnější studií zabývající se chronickým srdečním selháním je studie Framinghamská, která byla zahájena před 50 lety a účastnilo se jí již přes 10 000 dobrovolníků.

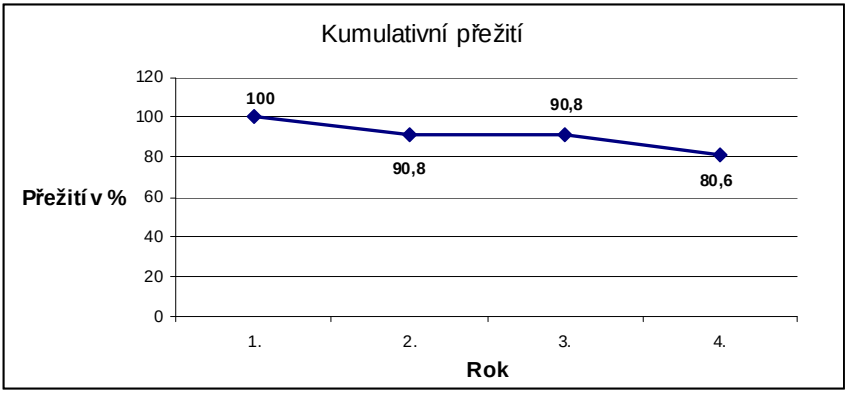
Náš soubor zahrnuje 86 pacientů, z toho 67 % mužů a 33 % žen. Věk pacientů se pohybuje v rozmezí 67 ±13,5 let, délka sledování 34 ±11 měsíců (14 až 56 měsíců), NYHA I – II/ II/ III 37/55/8 %, ejekční frakce levé komory 37 ± 12 %, diastolická dysfunkce 91 %. Za dobu sledování zemřelo 10 pacientů (11,6 %), z toho na kardiovaskulární komplikace 8 pacientů (9,3 %). Kumulativní přežití (95 %) bylo v 1. roce 100 %, ve 2. roce 90,8 (84,3 – 97,3) %, ve 3. roce 90,8 (84,3 – 97,3)% a ve 4. roce 80,6 (65,4 – 95,8) %.



Graf 1: Soubor pacientů s chronickým srdečním selháním

Tabulka 1: Vznik chronického srdečního selhání

příčiny	Muži	ženy	Celkem
Dilatační kardiomyopatie	10	4	14
Ischemická choroba srdeční	43	17	60
Infarkt myokardu	34	12	46
Posttachy	0	1	1
postmyokarditis	5	3	8
Hypertenze	45	20	65



Graf 2: Přežití pacientů zahrnutých do studie

Diskuse

Mortalita zjištěná ve Framinghamské studii vysoce převyšuje mortalitu našeho souboru, což je pravděpodobně dáno zlepšením farmakologické i nefarmakologické terapie pacientů se srdečním selháním a také mírně odlišným spektrem pacientů. Do našeho souboru jsou zahrnuti pouze pacienti s chronickým srdečním selháním, na rozdíl od Framinghamské studie, takže tak vysoké kumulativní přežití považujeme za úspěch. Jsme si vědomi limitace této práce, kterou je velikost souboru. Ve sběru dat nadále pokračujeme (nyní zpracováno 180 pacientů).

Příspěvek k patogenezi kalcifikované aortální stenózy – vaskularizace chlopní

Lukáš Krbal

Školitel: prof. MUDr. Ivo Šteiner, CSc.
Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN Hradec Králové

Úvod

Kalcifikovaná aortální stenóza (KAS) je dnes v rozvinutých zemích nejčastější chlopenní vadou. Zatímco dříve byly chlopenní vady převážně původu porevmatického, jde dnes v naprosté většině o tzv. degenerativní vady. V jejich etiopatogenezi se uplatňují vlivy mechanické (opakovaný ohyb baze cípů, tlak krevního sloupce) i aterogenní (vyšší věk, hypercholesterolémie, hypertenze, diabetes mellitus). KAS je nověji považována za chorobu příbuznou ateroskleróze tepen. A obdobně jako je dnes ateroskleróza řazena mezi onemocnění zánětlivého původu, je i v etiopatogenezi KAS uvažován zánět. Dvěma nejčastějšími typy KAS je typ stařecký (sklerotický), vznikající v normální třícípé aortální chlopni a typ vznikající na podkladě vrozeně malformované-dvojcípé aortální chlopně.

Cílem naší práce bylo pomocí nálezů obecných známek zánětu - vaskularizace a zánětlivé infiltrace prokázat zánětlivý původ KAS.

Materiál a metody

Histologicky byly vyšetřeny resekované chlopně od 28 nemocných operovaných na Kardiochirurgické klinice FN HK pro KAS. Po odvápnění byly chlopně vyšetřeny histologicky (HE) a imunohistochemicky (CD 31 - krevní cévy, D2-40 - lymfatické cévy)

Výsledky

Demografická data

Typ aortální stenózy	Počet případů	Muži/Ženy	Průměrný věk (r.)
Stařecký „degenerativní“ (třícípá chl.)	18	11/7	70,7
Dvojcípá chl.	7	6/1	57,0
Neurčitý	3	2/1	63,0
CELKEM	28	19/9	66,5

Histologické nálezy

Krevní cévy (CD 31 pozitivní)	28 (100%)
Lymfatické cévy (D2-40 pozitivní)	14 (50%)
Cévy v bazi	14 (50%)
Ery v luminu cév	10 (36%) (z nich cévy v bazi 8x)
Chronické zánětlivé infiltráty	24 (86%)
Osifikace	5 (18%)

V četnosti nálezů vaskularizace, zánětlivé infiltrace i metaplastické kosti nebyl rozdíl mezi oběma typy KAS.

Diskuse

Normální srdeční chlopně nejsou vaskularizované a nejsou v nich zánětlivé infiltráty. Náš nález přítomnosti krevních i lymfatických cév a lymfocytárních infiltrátů výrazně podporuje zánětlivou teorii etiologie KAS, a to jak u typu stařeckého (trojcípá chlopeň), tak u typu na podkladě dvojcípé chlopně. Název "degenerativní" pro KAS se tedy jeví jako nevhodný. Bude diskutován i původ cév v chlopních.

Polymorfizmus biotransformačných génov glutatión S-transferázy a riziko vzniku karcinómu pľúc

Martina Mišániková

Školitelia: MUDr. Anton Dzian[1] , RNDr. Tatiana Matáková[2]
[1]Chirurgická klinika JLF UK a MFN Martin, [2]Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin

Úvod

Karcinóm pľúc predstavuje pre svoju vysokú incidenciu a vysokú mortalitu celosvetový problém. Ročne je na Slovensku diagnostikovaných približne 3000 nových prípadov, z ktorých je asi len 10% indikovaných na primárnu chirurgickú resekciu, ktorá je jedinou potenciálne kurabilnou liečebnou modalitou. Z toho vyplýva, že diagnostikovanie tohto ochorenia je obvykle až v pokročilých štádiách, často vhodných iba na paliatívnu liečbu. 5-ročné prežívanie všetkých klinických štádií je iba 15 - 18 %, čo determinuje jeho medicínsku aj spoločenskú závažnosť. Asi 90% karcinómov pľúc je spôsobených fajčením, 10-15% profesionálnou expozíciou karcinogénom, 1-2% sú dôsledkom znečistenia ovzdušia. Zaujímavý je údaj, že z celkového počtu fajčiarov len 10-25% naozaj ochorie na karcinóm pľúc a 10-15% všetkých pľúcnych karcinómov sa vyskytuje u nefajčiarov (1). Možným vysvetlením tejto individuálnej susceptibility je to, že organizmus disponuje rozsiahlym biotransformačným enzymatickým systémom, ktorého cieľom je detoxifikácia xenobiotík. Jedným zo spôsobov identifikácie osôb so zvýšeným rizikom vzniku nádorového ochorenia indukovaného xenobiotikami je sledovanie genetických polymorfizmov enzýmov zapojených do ich metabolizmu. Tieto enzýmy delíme na enzýmy I. fázy, ktoré sa podieľajú na premene inaktívnych karcinogénov na ich aktívnu elektrofilnú formu a enzýmy II. fázy, ktoré sa podieľajú na detoxifikácii genotoxických elektrofilných zlúčenín na neaktívne dobre vylúčiteľné hydrofilné zlúčeniny (2). Od týchto enzýmov závisí, či sa neaktívny prokarcinogén zmení na aktívny karcinogén, alebo sa deaktivuje a následne vylúči. Glutatión-S-transferáza (GST) predstavuje superrodinu II. fázy detoxifikačných enzýmov metabolizujúcich xenobiotiká. V tomto procese zohráva centrálnu úlohu. Glutatión-S-transferázy katalyzujú konjugáciu elektrofilných molekúl s glutationom, čo umožňuje ich ďalší metabolizmus a následnú premenu na deriváty ľahko vylúčiteľné močom. Najintenzívnejšie študované sú polymorfizmy génov GSTT1, GSTM1, GSTP1, pričom existuje veľká interindividuálna variabilita v expresii týchto enzýmov, spôsobujúca zmeny ich aktivity prípadne jej úplnú stratu, z čoho možno usudzovať, že ich genetický polymorfizmus môže byť asociovaný s rizikom vzniku karcinómu pľúc. V GSTM1 a GSTT1 génoch boli identifikované delečné mutácie, ktoré majú za následok kompletnú stratu aktivity enzýmov. Ak sú vyradené obidve alely označujeme tento genotyp ako GSTM1 null a GSTT1 null . V prípade polymorfizmu GSTP1 ide o zámenu aminokyselín (Ile→Val) v polohe 105. Výsledkom sú tri variantné genotypy, kde heterozygotná a homozygotná varianta Val105 má za následok zníženú aktivitu enzýmu.

Cieľom práce bolo sledovanie výskytu polymorfizmov génov GSTs a ich kombinácií, ako možných prediktívnych faktorov v rozvoji karcinómu pľúc.

Metodika

Do štúdie typu case-control bolo zaradených 160 pacientov s histologicky verifikovaným karcinómom pľúc hospitalizovaných na Chirurgickej klinike, na Klinike tuberkulózy a pľúcnych chorôb JLF UK a v Centre hrudníkovej chirurgie vo Vyšných Hágoch v rokoch 2006-2008. Do kontrolnej skupiny bolo zaradených 220 zdravých dobrovoľníkov a pacientov hospitalizovaných s nenádorovým ochorením. Genomická DNA bola izolovaná fenol-chloroformovou extrakciou z venóznej krvi. Genetické polymorfizmy GSTM1, GSTT1 a GSTP1 boli determinované použitím polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Produkty PCR boli analyzované gélovou elektroforézou. Štatistické vyhodnotenie výsledkov a zhoda genotypových distribúcií s Hardy-Weinbergovou rovnováhou bola testovaná pomocou chí-kvadrát testu. ODDs ratio (OR) a 95% konfidenčný interval (95% CI) bol použitý k výpočtu rizika rozvoja karcinómu pľúc vo vzťahu k jednotlivým polymorfizmom ako aj ich kombináciám.

Výsledky

Pri sledovaní GSTT1 a GSTP1 genotypov samostatne neboli zaznamenané štatisticky signifikantné rozdiely. Genotyp GSTM1 null predstavoval 1,56 násobné riziko rozvoja karcinómu pľúc (95% CI = 1,03-2,35; p = 0.04). Pri kombináciách genotypov je rizikovou kombináciou GSTT1 null a GSTM1+, ktorá predstavuje 2,21 násobné riziko rozvoja karcinómu pľúc (95% CI = 1,09-4,49; p = 0.04), kombinácia GSTT1+ a GSTM1 null, predstavujúca 1,98 násobné riziko rozvoja karcinómu pľúc (95% CI = 1,22-3,18; p = 0.006) a kombinácia GSTM1 null a GSTP1 Ile/val, predstavujúca 2,04 násobné riziko rozvoja karcinómu pľúc (95% CI = 1,11-3,76; p = 0.03). Ďalej boli sledované kombinácie genotypov GSTM1, GSTT1 a GSTP1. Rizikové boli nasledovné kombinácie: GSTT1+, GSTM1 null, GSTP1 Ile/ile prestavujúca 2,01 násobné riziko rozvoja karcinómu pľúc (95% CI = 1,05-3,87; p = 0.05); GSTT1+, GSTM1 null a GSTP1 Ile/val s 3,18 násobným rizikom (95% CI = 1,53-6,59; p = 0.003) a kombinácia GSTT1 null, GSTM1+, GSTP1 Ile/ile s 3,3 krát vyšším rizikom vzniku karcinómu pľúc (95% CI = 1,27-8,64; p = 0.02).

Diskusia

Recentné štúdie a metaanalýza ukazujú, že GSTM1 null genotyp je asociovaný so zvýšeným rizikom pre vznik a rozvoj karcinómu pľúc (3-5), čo je v súlade aj s našimi zisteniami. Čo sa týka vzťahu polymorfizmov GSTT1, GSTP1 a tiež kombinácií jednotlivých genotypov ku karcinómu pľúc, výsledky štúdií sú nejednotné. Niektoré štúdie uvádzajú GSTT1 null genotyp ako mierne rizikový, avšak toto riziko nebolo signifikantné (6,7), iné žiaden vplyv nenašli (5,8). Štúdie zamerané na sledovanie asociácií medzi GSTP1 polymorfizmom v kodóne 105 a pľúcnym karcinómom

nepotvrdili signifikantné riziko GSTP1 Val genotypu (9,10). V našej štúdii nebola potvrdená asociácia GSTT1 null a GSTP1 Val genotypu s karcinómom pľúc. Aby sa potvrdil vplyv genetických polymorfizmov prispievajúcich k náchylnosti k vzniku a rozvoju karcinómu pľúc bude potrebná genotypizácia ďalších génov zúčastňujúcich sa detoxifikačných a reparačných procesov. Komplexná genotypizácia týchto polymorfizmov v budúcnosti prispeje k objasneniu genetickej susceptibility ku karcinómu pľúc a napomôže tak zdokonaleniu prevencie a aj liečby konkrétneho pacienta.

Použitá literatúra

1. Mattson ME, Pollack ES, Cullen JW. What are the odds that smoking will kill you? Am J Public Health 1987; 77:425–431.

2. Šalagovic, J., Kalina, I., Dudas, M. Genetic polymorphism in xenobiotics metabolizing enzymes as a susceptibility factor to cancer. In: Bratislavské lekárske listy, 2000; 101: 512-521.

3. McWilliams, JE., Sanderson, BJ., Harris, EL., Richert-Boe, KE. and Henner, WD. Glutathione S-transferase M1 deficiency and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995; 4: 589-594.

4. Ford, JG., Li, M., O´Sullivan, MM., Demopoulos, R., Garte, S., Taioli, E. and Brandt-Rauf, PW. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans,. Carcinogenesis, 2000; 21: 1971-1975.

5. Lan, Q., He, X., Costa, DJ., Tian, L., Rothman N., Hu, G. and Mumford, JL. Indoor coal combustion emissions, GSTM1 and GSTT1 genotypes, and lung cancer risk: a case-control study in Xuan Wei, China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000; 9: 605-608.

6. To-Figueras, J., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Galan, MC., Fuentes, M., Ramon, JM., Rodamilans, M., Huguet, E. and Corbella, J. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. Carcinogenesis, 1997; 18: 1529-1533.

7. Salagovic, J., Kalina, I., Stubna, J., Habalova, V., Hrivnak, M., Valansky, L., Kohut, A. and Biros, E. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. Neoplasma, 1998; 45: 312-317.

8. Saarikoski, ST., Voho, A., Reinikainen, M., Anttila, S., Karjalainen, A., Malaveille, C., Vainio, H., Husgafvel-Pursiainen, K. and Hirvonen, A. Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. Int J Cancer, 1998; 77: 516-521.

9. Perera, FP., Mooney, LA., Stampfer, M., Phillips, DH., Bell, DA., Rundle, A., Cho, S., Tsai, WY., Ma, J., Blackwood, A. and Tang, D. Associatons between

carcinogen-DNA damage, glutathione S-transferase genotypes, and risk of lung cancer in the prospective Physicians Health Cohort Study. Carcinogenesis, 2002; 23: 1641-1646.

10. Wang, Y., Spitz, MR., schabath, MB., Ali-Osman, F., Mata, H. and Wu, X. association between glutathione S-transferase p1 polymorphisms and lung cancer risk in Caucasians: a case-control study. Lung Cancer, 2003; 40: 25-32.

Inhibition of transforming growth factor beta-1 augments liver regeneration after partial portal vein ligation in porcine experimental model

Jan Brůha

Co-author : Ondřej Vyčítal
Supervisors: MUDr. Václav Liška PhD., prof. MUDr. Vladislav Třeška, PhD.
Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital in Pilsen

Introduction

Progress in surgical procedures has extended the possibilities of liver surgery and has made possibilities to perform radical resections of malignant liver lesions. Nevertheless, many patients are not indicated to the radical surgical therapy that could extend their chance of complete remission of malignancy, because of the higher risk of acute liver failure after extended liver resection(1). Portal vein embolization (PVE) could increase the future liver remnant volume (FLRV) before the scheduled extended liver resection(2). Compensatory hyperplasia of the contralateral liver lobe is initiated by PVE or portal vein ligation (PVL) (3) of the portal branch of the malignancy afflicted liver lobe that underlies atrophy. Main reason for resorting to liver resection after PVE is unsuccessful hypertrophy of the FLRV or progression of the malignancy.

The proliferative phase of liver regeneration is terminated by an increased serum level of the Transforming growth factor-beta1(TGF-β1), because TGF-β1 inhibits DNA synthesis and plays a pivotal role in the down-regulation of liver regeneration(4,5). The aim of this study was to accelerate the regeneration of liver parenchyma after PVL by application of monoclonal antibody against TGF-β1 and so extend phase of liver regeneration in large animal experimental model.

Methods

Sixteen piglets were included in study (9 in the control group and 7 in the TGF-β1 group).

Central laparotomy was performed. The portal vein branches for the caudate, right lateral and right medial lobes were ligated. The blood flow in the hepatic artery branches and occlusion of the portal vein branches were controlled by Doppler ultrasonography. At the end of operation the port-a-cath was introduced into the superior caval vein (6,7). The Monoclonal antibody against TGF-β1(MAB-TGF-β1)- MAB1032, Chemicon International, Inc., USA(8)- (TGF-β1 group) or a physiological solution (control group) were applied into the central venous catheter 24 hours after partial PVL.

Blood samples were collected from the central vein catheter. Biochemical parameters were focused on liver functions to detect the influence of the applied monoclonal antibody on organism and to recognise possible differences between TGF-β1 and the control group. Serum levels of bilirubin, urea, creatinine, alkaline phosphatase, gammaglutamyltransferase, cholinesterase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and albumin were assessed.

The ultrasonographic controls were performed immediately after surgical procedure and on the 3rd, 7th, 10th and 14th postoperative days.

The piglets were sacrificed on the 14th day under deep general anaesthesia with a concentrated solution of potassium chloride. The piglets were dissected and the atrophic and hypertrophic liver lobes were measured. Bioptic samples from the atrophic and hypertrophic lobes were taken and stored in formaldehyde and also frozen.

The biopsies from the atrophic and hypertrophic parenchyma were examined after staining with hematoxylin-eosine and periodic acid-Schiff. The proliferation activity was examined using antibody Ki67. The amount of binucleated hepatocytes were measured in 20 microscopic fields, the size of the hepatocytes and the length of the lobuli were also examined.

Results

The volume of hypertrophic lobes grew more rapidly after application of MAB TGF-β1, whereas the control group had a slow continual growth in the hypertrophic liver lobes during the whole follow-up period. The augmentation of hypertrophic lobes growth was maximal between the 3rd and 7th postoperative days in comparison with the control group (fig.1). Nevertheless, on the 14th postoperative day there were no statistically significant differences.

The serum levels of studied biochemical parameters were comparable in both experimental groups and the differences show no statistical significance at each timepoint. No adverse reaction on MAB application was observed (fig.2and 3).

The histological examination was performed on biopsies that were conducted at the end of the experiment. The differences in length of lobuli were not statistically significant. Statistical analysis also showed no significant increase in the quantity of binucleated hepatocytes in the hypertrophic liver lobes in the TGF-β1 group . We observed a larger distribution of the number of binucleated hepatocytes per field in the hypertrophic lobe from TGF-β1 group in contrast to the control group. The test of normality demonstrated a normal distribution of this parameter in each animal in both experimental groups. The size of hepatocytes was also not proved to be a significant parameter. Proliferative activity in both groups was greatly reduced.

Discussion

The use of large animals especially piglets in this study is very appropriate in relation to the human medicine and clinical surgery because of the similar physiology of piglets and the human body. The results of the present study confirm previous findings gained using in vitro models and in experiments with small laboratory animals. The selected concentration and timing of the application of monoclonal antibody prolonged acceleration of liver parenchyma regeneration. The secondary effects that could be hypothesized after application of the monoclonal antibody against key pleiotropic growth factor were not observed either during application or in the postoperative period. The absence of significant differences between serum levels of the studied biochemical parameters at particular points in time also demonstrates that there was no unsuitable influence of the applied cytokine on the liver function. These results support our ideas to choose monoclonal antibody against TGF-β1 for future clinical studies in human liver surgery.

The larger distribution of the number of binucleated hepatocytes in the hypertrophic parenchyma of TGF-β1 group in comparison with the control group could be explained by incomplete liver regeneration at the end of experiment. Because there are practically no mitotic figures, or the amount is the same as in the normal liver parenchyma without any surgical procedures or toxic insult, it was possible to hypothesize that the first phase of liver regeneration was finished and the next phase of regeneration was proceeding (9).

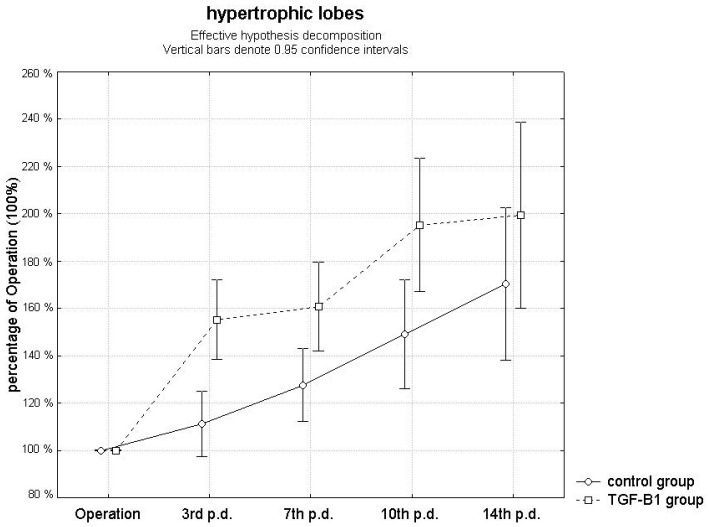
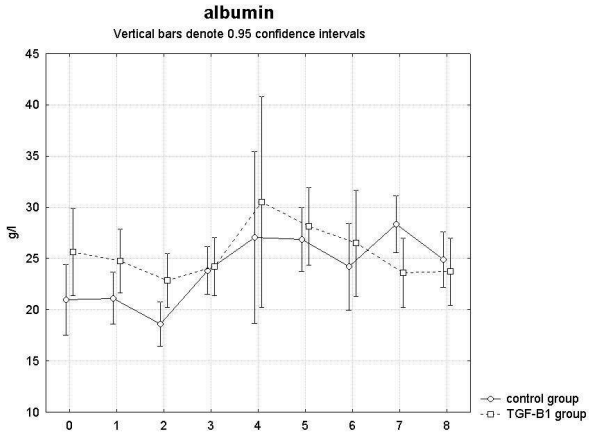


Figure 1.: Comparison of the growth of hypertrophic liver lobes between TGF-β1 and control groups. (p.d. = postoperative day).



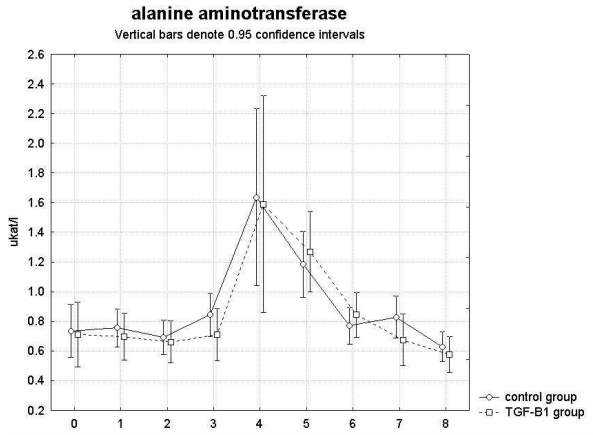


Figure 2. and 3.: Comparison of serum levels of albumin and alanine aminotransferase of the studied biochemical parameters between TGF-β1 and control groups.

Conclusion

The present study describes a new usage of a monoclonal antibody against TGF-β1 in large animal model, which simulates the situation in human medicine. The experimental results could be settings for a clinical study in patients with a low response regeneration of FLRV after portal vein embolization that does not allow surgical treatment.

This article was supported by grant IGA MZ CR NR 9731-4 and 9727-4 and research project MSM 0021620819 (Replacement and support of certain vital organs).

References

1. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML and Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. N Engl J Med 2007; 356: 1545-1559.

2. Makuuchi M, Thai BL, and Takayasu K. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma. A preliminary report. Surgery 1990; 107: 521-527.

3. Broering DC, Hillert C and Krupski G. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. J Gastrointest Surg 2002; 6: 905-913.

4. Armendariz-Borunda J, Katai H, Jones CM, Seyer JM, Kang AH, Raghow R. Transforming growth factor beta gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after CCl4 treatment. Lab Invest 1993; 69: 283-294.

5. Armendariz-Borunda J, LeGros L, Campollo O, Panduro A, Rincon AR. Antisense S-oligodeoxynucleotides down-regulate TGFbeta-production by Kupffer cells from CCl4-injured rat livers. Biochim Biophys Acta 1997; 12: 241-252.

6. Liska V, Treska V, Mirka H et al. Interleukin-6 Augments Activation of Liver Regeneration in Porcine Model of Partial Portal Vein Ligation. Anticancer Research 2009; 29(6): 2371-7

7. Liska V, Slowik P, Eggenhofer E et al. Intraportal Injection of Porcine Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Augments Liver Regeneration after Portal Vein Embolization. In Vivo, 2009; 23: 229-235.

8. Deneme MA, Ok E, Akcan A, Akyildiz H, Soyuer I, Muhtargolu S. Single dose of anti-transforming growth factor-beta1 monoclonal antibody enhances liver regeneration after partial hepatectomy in biliary-obstructed rats. J Surg Res 2006; 136: 280-287.

9. Mangnall D, Bird NC and Majeed AW. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. Liver international 2003; 23: 124-138.

Dominance of topical negative pressure in the treatment deep sternal wound infection in cardiothoracic surgery

Patrick Tobbia

Supervisor: MUDr. Martin Šimek PhD.

Department of Cardiac Surgery, Palacký University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic

Introduction

Deep sternal wound infection (DSWI) is considered as an ongoing and challenging problem of modern cardiac surgery. It affects 0.5% to 5% of patients, nevertheless, it carries a considerable mortality rate ranging from 10% to 37%, long-term morbidity of survivors and almost 3 times higher cost than uncomplicated surgery. Several treatment strategies have been adopted for the treatment of DSWI including surgical debridement with closed irrigation, open dressing with delayed chest reconstruction, and more recently, with the application of topical negative pressure (TNP) prior to chest closure. However, there is little consensus among surgical teams on the ideal approach to the management of DSWI.

Our aim was to compare clinical outcomes, in-hospital mortality and 1-year survival of two different treatment modalities of deep sternal wound infection, topical negative pressure and the conventional therapy.

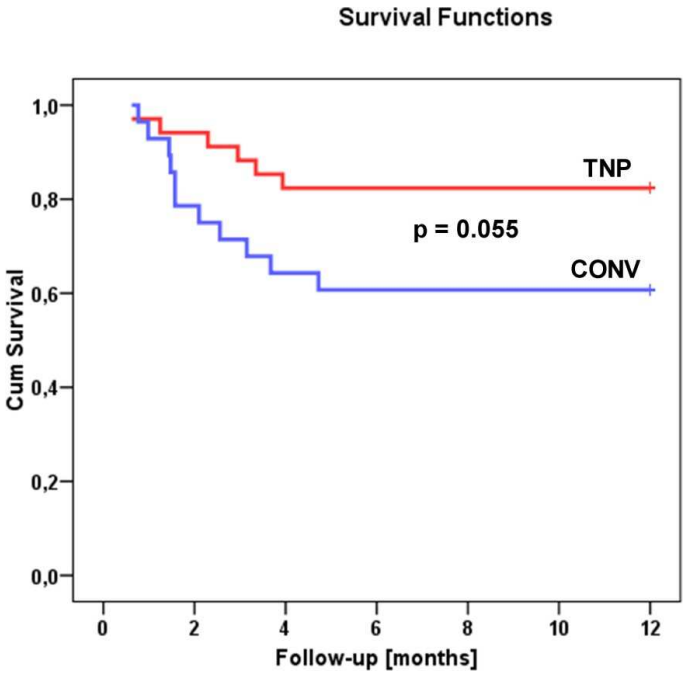
Methods

In the study 66 consecutive patients treated for deep sternal infection at the department of cardiosurgery were monitored. A total of 28 patients underwent conventional treatment (February 2002 through September 2004). And 34 patients had the application of topical negative pressure (November 2004 through December 2007). Four patients who underwent a combination of both strategies were excluded from the study. Clinical and wound care outcomes were compared, focusing on therapeutic failure rate, in-hospital stay and the 1-year mortality of both treatment strategies.

Results

Topical negative pressure was associated with a significantly lower failure rate of the primary therapy ($p<0.05$), shortening of the intensive care unit stay ($p<0.001$), a particular decrease in the in-hospital stay ($p<0.05$) and the 1-year mortality ($p<0.05$).

Comparable overall length of therapy, in-hospital stay and the risk of wire-related fistulas after chest reconstruction were found.



Discussion

Our results suggest the superiority of TNP over closed irrigation in the treatment of DSWI following cardiac surgery. With very low therapeutic failure rates, significant decrease in the in-hospital stay, and lower 1-year mortality were achieved by TNP. Nevertheless, primary application of TNP was associated with a higher frequent of reconstructive surgeries used to cover the residual soft tissue defects in our patient's cohort ($p<0.001$).

References

1. Lepelletier D, Perron S, Bizouarn P, Caillon J, Drugeon H, Michaud JL, Duveau D (2005). Surgical-site infection after cardiac surgery: Incidence, microbiology, and risk factors. Infect Control Hosp Epidemiol 26:466-72

2. Francel TJ, Kouchoukos NT (2001). A rational approach to wound difficulties after sternotomy: The problem. Ann Thorac Surg 72:1411-8

3. Toumpoulis IK, Anagnostopoulos CE, Derose JJ Jr, Swistel DG (2005). The impact of deep sternal wound infection on long-term survival after coronary artery bypass grafting. Chest 127:464-71

4. Hollenbeak CS, Murphy DM, Koenig S, Woodward RS, Dunagan WC, Fraser VJ (2000). The clinical and economic impact of deep chest surgical site infections following coronary artery bypass graft surgery. Chest 118:397-402

5. Ascherman JA, Patel SM, Malhotra SM, Smith CR (2004). Management of sternal wounds with bilateral pectoralis major myocutaneous advancement flaps in 114 consecutively treated patients: Refinements in technique and outcomes analysis. Plast Reconstr Surg 114:676-83

6. Kirsch M, Mekontso-Dessap A, Houel R, Giroud E, Hillion ML, Loisance DY (2001). Closed drainage using redon catheters for poststernotomy mediastinitis: Results and risk factors for adverse outcome Ann Thorac Surg 71:1580-6

7. Fleck TM, Fleck M, Moidl R, Koller R, Giovanoli P, Wolner E, Grabenwoger M (2002). The vacuum-assisted closure system for the treatment of deep sternal wound infection after cardiac surgery. Ann Thorac Surg 74:1596-600

8. Schimmer C, Sommer P, Bensch M, Elert M, Leyh R (2008). Management of poststernotomy mediastinitis: experience and results of different therapy modalities. Thorac Cardiovasc Surg 56:200-4

9. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR (2002). The hospital infection control practise advisory committee. Guidelines for prevention of surgical site infection. Infect Control Hosp Epidemiol 20:247-78

10. El Oakley R, Wright J (1996). Postoperative mediastinitis: Classification and management. Ann Thorac Surg 61:1030-6

Gilbertov syndróm - vplyv benígnej hyperbilirubinémie na markery oxidačného stresu a na lipidový profil

Tomáš Sýkora

Školitelia: RNDr. Zuzana Paduchová, PhD[1]., MUDr. Ivan Očadlík[2]
[1]Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Bratislava, [2]II. Interná klinika LF UK, Bratislava

Úvod

Bilirubín bol dlho označovaný ako potenciálne toxický produkt degradácie hému až do roku 1987, kedy sa zistil jeho ochranný a antioxidačný účinok. Ďalší výskum ukázal jeho možný protektívny vplyv pred vznikom aterosklerózy, autoimunitných a nádorových chorôb (1,2,3,4).

Gilbertov syndróm (GS) je charakterizovaný benignou hepatálnou hyperbilirubinémiou s koncentráciou celkového bilirubínu v rozpätí od 20-90 µmol/L, preto sme si ho vybrali za modelový systém. Vysoká hladina bilirubínu je spôsobená mutáciou génu pre enzým UDP glukuronozyltransferáza 1A1 (UGT). Genetický kód GS pre tento enzým predstavuje polymorfiznus 7/7, kým normobilirubinemickí jedinci majú polymorfizmus 7/6 alebo 6/6. V dôsledku tejto mutácie je enzýmová aktivita znížená o 1/3, čo vedie k zvýšeniu hladiny nekonjugovaného bilirubínu.

Naším cieľom bolo zistiť vplyv chronicky zvýšeného bilirubínu na hladiny markerov oxidačného stresu a zistiť zmeny v lipidovom profile u GS.

V štúdii sme sledovali oxidačné poškodenie DNA lymfocytov a citlivosť DNA na oxidačné poškodenie peroxidom vodíka stanovením markera 8-oxoGuanín (8-oxoG), oxidačné poškodenie lipidov (lipoperoxidy), proteínov (karbonyly proteínov) a celkovú antioxidačnú schopnosť. Ďalej sme sledovali hladinu nitrotyrozínu (NT), ktorý je koncovým produktom oxidácie peroxinitrátov. Posledným sledovaným parametrom bol adiponektín. Predstavuje produkt tukového tkaniva, ktorého zvýšená hladina má ochranný vplyv pred kardiovaskulárnymi ochoreniami, zápalom a inzulínovou rezistenciou.

Materiál a metodika

Do štúdie bolo zaradených 31 dobrovoľníkov (Ž/M=13/18) rozdelených na základe genetického testu na polymorfizmus génu pre enzým UGT do dvoch skupín. Štrnásť dobrovoľníkov s polymorfizmom 7/7 bolo zaradených do skupiny s GS a sedemnásť dobrovoľníkov s polymorfizmom 6/6 a 6/7 bolo zaradených do kontrolnej skupiny (K).

V kontrolnej skupine boli dvaja dobrovoľníci s celkovým bilirubínom >20 µmol/L. Aj napriek tomu, že sa u nich polymorfizmus 7/7 nepreukázal, zaradili sme ich do skupiny GS. Dobrovoľníci boli informovaní o cieli výskumu, vyplnili dotazník o životospráve a podpísali informovaný súhlas.

Venóznu krv sme odoberali do komerčných skúmaviek s antikoagulantom (EDTA) a bez antikoagulanta. Krv s EDTA sme použili na izoláciu lymfocytov a krvnej plazmy. Z krvi bez antikoagulanta sme pripravili sérum. Vzorky plazmy a séra sme rozdelili na alikvóty, rýchlo zmrazili a uložili na -80°C na ďalšie spracovanie.

Z krvi boli stanovené základné biochemické parametre na OKB FNsP, Bratislava-Staré mesto.

Na stanovenie oxidačného poškodenia DNA lymfocytov a poškodenia DNA vplyvom peroxidu vodíka (H2O2) (0,1 mmol/L,5 min,4°C) sme použili modifikovanú kométovú metódu podľa Collinsa (5). Hladinu oxidačného poškodenia DNA a hladinu poškodenia DNA H2O2 sme vyjadrili ako 8-oxoG na 106Guanínov.

Na stanovenie celkovej antioxidačnej schopnosti séra sme použili metódu podľa Re a kol. (6) pri vlnovej dĺžke 734 nm. Ako štandard sme použili Trolox a antioxidačnú schopnosť sme vyjadrili v alikvótoch Troloxu (mmol/L).

Na stanovenie lipoperoxidov v sére sme použili metódu podľa el-Saadaniho a kol. (7) pri vlnovej dĺžke 365 nm. Koncentráciu lipoperoxidov sme vyjadrili v nmol/ml.

Na stanovenie karbonylov sme použili ELISA test podľa Bussa a kol. (8). Hladinu karbonylov sme vyjadrili v nmol/mg proteínov.

Hladiny nitrotyrozínu (nmol/L) a adiponektínu (µg/ml) sme stanovili prostredníctvom komerčných ELISA testov.

Naše výsledky reprezentujú priemer ± SEM pre normálne distribuované parametre, ktoré sme vyhodnotili Studentovým t-testom. Na stanovenie vzťahu medzi bilirubínom a markermi oxidačného stresu, a medzi markermi v skupine K a GS sme použili Spearmanov test. Na štatistické vyhodnotenie výsledkov sme použili program StatsDirect® 2.3.7 (StatsDirect Sales, Sale, Cheshire M33 3UY, UK).

Výsledky

Na základe výsledkov dotazníka o životospráve dobrovoľníkov sme zistili, že medzi skupinami nie sú výrazné rozdiely, a preto získané výsledky nie sú týmto ovplyvnené.

Výsledky skúmaných parametrov uvádzame v tabuľke 1.

Tabuľka 1.

Parameter	Kontrola (n=15, Ž/M=5/10)	Gilbertov syndrom (n=16, Ž/M=8/8)	P
Vek (roky)	27,33±2,25	30,13±3,45	0,510
Celkový bilirubín (μmol/L)	8,813±0,841	30,750±3,214	<0,001
Celkový cholesterol (mmol/L)	4,993±0,202	4,613±0,280	0,284
HDL (mmol/L)	1,677±0,100	1,432±0,099	0,093
LDL (mmol/L)	2,641±0,161	2,678±0,195	0,886
TAG (mmol/L)	1,485±0,142	1,106±0,099	0,037
Aterogénny index	3,138±0,145	3,243±0,158	0,630
Oxidačné poškodenie DNA (8-oxoG/106G)	0,621±0,116	0,351±0,078	0,064
Poškodenie DNA H2O2 (8-oxoG/106G)	2,119±0,165	1,126±0,164	<0,001
Lipoperoxidy (nmol/ml)	70,124±14,210	53,291±2,693	0,240
Celková antioxidačná schopnosť (mmol/L)	2,579±0,113	2,493±0,115	0,598
Nitrotyrozín (nmol/L)	21,568±0,947	19,485±0,688	0,090
Karbonyly (nmol/mg proteínov)	0,313±0,002	0,315±0,002	0,493
Adiponektín (μg/ml)	6,271±2,887	7,051±2,864	0,849

Ako sme predpokladali, skupina GS mala v porovnaní s K signifikantne zvýšený bilirubín (P<0,001). V skupine GS sme zistili signifikantne znížené triacylglyceroly (P= 0,0368) a zníženú citlivosť na poškodenie DNA peroxidom vodíka (P=0,0002) oproti kontrolám. Zistili sme výrazné zníženie na hranici štatistickej významnosti u HDL, nitrotyrozínu a 8-oxoG v skupine GS v porovnaní s kontrolami.

Na zistenie vplyvu rôznej hladiny bilirubínu na lipidový profil a markery oxidačného stresu sme spojili skupiny K a GS. Zistili sme, že bilirubín nám negatívne koreloval s TAG, HDL, NT, poškodením DNA vplyvom H2O2 a pozitívne koreloval s adiponektínom a karbonylmi (Tab.2).

Tabuľka 2.

Porovnané parametre v celom súbore	Rovnica priamky	n	r	P
Bilirubín vs. TAG	y=-0,0164x+1,6021	31	- 0,4714	0,0014
Bilirubín vs. HDL	y=-0,0101x+1,753	31	- 0,3619	0,0518
Bilirubín vs. NT	y=-0,0353x+21,257	29	- 0,1597	0,0247
Bilirubín vs. Poškodenie DNA H2O2	y=-0,0324x+22558	30	- 0,5814	0,0011
Bilirubín vs. Adiponektín	y=0,3158x+0,3142	31	0,4126	0,0347
Bilirubín vs. Karbonyly	y=0,0002x+0,3107	28	0,3097	0,0087

Diskusia

Ateroskleróza je chronické zápalové ochorenie ciev, prevažne artérií. Na jeho patogenéze sa vo významnej miere podieľa aj oxidačný stres. Národný prieskum USA dokázal, že s nárastom bilirubínu o 1,71 μmol/L sa znižuje riziko vzniku aterosklerózy o 6% (2).

V poslednom čase sa venovalo veľa štúdií sledovaniu účinkov bilirubínu na ochorenia kardiovaskulárneho systému, najmä aterosklerózy. Autori v nich popisujú, že funkcia bilirubínu má imunomodulačné účinky, inhibuje proliferáciu hladkej svaloviny ciev a chráni pred tvorbou trombov (1,2,3,4). V našej štúdii sme nenašli signifikantný rozdiel v hladinách markerov oxidačného poškodenia medzi kontrolnou skupinou a GS, okrem hraničnej signifikancie pre 8-oxoG a NT, ale napriek tomu sme dokázali ich závislosť od koncentrácie bilirubínu.

V našej štúdii sme zistili negatívnu koreláciu medzi NT (markerom poškodenia proteínov s ONOO-, ktorý sa tvorí z nadprodukcie NO a O2-) a bilirubínom. Korelácia medzi bilirubínom a celkovou antioxidačnou schopnosťou sa však nezistila. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že antioxidačná schopnosť bilirubínu pravdepodobne nespočíva v priamej eliminácii oxidantov, ale skôr cez biomodulačnú aktivitu buď stimulácie expresie a/alebo aktivity antioxidačných, prípadne reparačných enzýmov.

V súčasnosti je známe, že bilirubín má cytoprotektívny účinok (9). V našej štúdii sme dokázali signifikantne znížené poškodenie DNA vyvolané H2O2 u GS. Ďalej sme zistili, že zvýšená hladina bilirubínu znižovala oxidačné poškodenie DNA lymfocytov. Zatiaľ nie je známy presný mechanizmus protektívneho účinku bilirubínu pri ochrane DNA, a preto bude zaujímavé zistiť, či zvýšený bilirubín ovplyvňuje aktivitu reparačných enzýmov.

Naše výsledky potvrdzujú, že jedinci s hyperbilirubinémiou majú znížený oxidačný stres a odlišný lipidový profil v porovnaní s normobilirubinemickou kontrolnou skupinou, čo pravdepodobne môže znižovať riziko vzniku aterosklerózy oproti normálnej populácii.

Poďakovanie

Za cenné rady a pomoc pri realizovaní tejto práce ďakujem prof. Ing. Zdeňke Ďuračkovej, PhD., doc. MUDr. Jánovi Chandogovi CSc. a MUDr. Stelle Hlinšťákovej.

Tento projekt bol podporený v rámci programu „Máš pocit, že máš na viac?“ Konta Orange, n.f.

Použitá literatúra

1. Öllinger R, Bilban M, Erat A , Froio A, McDaid J, Tyagi S, Csizmadia E, Graça-Souza AV, Liloia A, Soares MP, Otterbein LE, Usheva A, Yamashita K, Bach FH. Bilirubin. A Natural Inhibitor of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. Circulation 2005; 112:935.

2. Perlstein TS, Pande RL, Beckman JA, Creager MA. Serum total bilirubin level and prevalent lower-extremity peripheral arterial disease: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 to 2004. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(1):166-72.

3. Vítek L. Impact of Serum Bilirubin on Human Diseases. Pediatrics 2005;115:1411-1412.

4. Liu Y, Li P, Lu J, Xiong W, Oger J, Tetzlaff W, Cynader M.Bilirubin Possesses Powerful Immunomodulatory Activity and Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Journal of Immunology, 2008;181: 1887-1897.

5. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. Mol. Biotech. 2004;26:249-61.

6. Re R, Pellegrini N, Protteggente A, Pannala A, Yang M, Rice- Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 1999;26:1231-1237.

7. el-Saadani M, Esterbauer H, el-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jurgens G. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. Journal of Lipid Research 1989;30: 627- 630.

8. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. Free Radic Biol Med. 1997;23(3):361-6.

9. Vítek L, Kráslová I, Muchová L, Novotný L, Yamaguchi T. Urinary excretion of oxidative metabolites of bilirubin in subjects with Gilbert syndrome. J Gastroenterol Hepatol. 2007;(6):841-5.

Hodnocení úrovně znalostí první pomoci u studentů gymnázií

Luděk Hána, Tomáš Veleta

Školitel: MUDr. Radovan Matoušek, PhD.
Katedra všeobecného lékařství a urgentní medicíny Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové

Úvod

Podle Rámcového vzdělávacího programu pro gymnázia (1) by měl Školní vzdělávací program obsahovat vzdělávací oblast Člověk a zdraví se vzdělávacím oborem Výchova ke zdraví - náplní je kromě jiného i osvojení způsobů účelného chování a poskytnutí (zajištění) nezbytné pomoci v situacích ohrožení zdraví a bezpečí. To by mělo probíhat v hodinách tělesné výchovy nebo biologie alespoň jednou ročně. Z důvodu nízké hodinové dotace, velkého množství jiných témat a neodpovídající kvalifikace vyučujících výuka první pomoci není realizována v dostatečné míře. Cílem naší studie bylo zhodnotit znalosti poskytování první pomoci u vybrané skupiny studentů a dále posoudit vliv nárazové výuky první pomoci na celkovou úroveň znalostí dané problematiky.

Metodika

Jako statistický soubor jsme zvolili studenty 3. ročníků gymnázií. Do studie bylo zařazeno celkem 747 studentů, z toho 273 mužů a 474 žen. Průměrný věk ve statistickém souboru byl 17,7 roku. Studentům byl nejprve předložen test ze základů neodkladné resuscitace sestavený podle The European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2005 (2, 3). Po testu následovala teoretická výuka základů neodkladné resuscitace spojená s ukázkou pomůcek a poté i praktickým nácvikem v celkovém rozsahu dvou vyučovacích hodin. S měsíčním odstupem studenti psali stejný test jako v úvodu. O tomto druhém testu studenti předem nevěděli.

Výsledky

V prvním testu byla úspěšnost studentů v průměru okolo 50%, ve druhém testu stoupla úspěšnost na asi 75%. 95% studentů dosáhlo ve druhém testu zlepšení oproti testu prvnímu. Podle počtu správných odpovědí na jednotlivé otázky je zřejmé, že některé oblasti kardiopulmonální resuscitace jsou pro studenty obtížnější. Nejhorších výsledků studenti dosahovali u otázek týkajících se neodkladné resuscitace dětí.

Diskuse

Z dosažených výsledků je zřejmé, že znalost dané problematiky ve sledované skupině je neuspokojivá a že i nárazová výuka první pomoci má prokazatelný vliv na úroveň znalostí. Pro zlepšeni situace je třeba zkvalitnit a systematizovat výuku první pomoci. Toho by bylo možno dosáhnout nejen za přispění příslušných orgánů krajských úřadů, ale i ve spolupráci s Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a se složkami Integrovaného záchranného systému, které by zajišťovaly pomoc po odborné stránce.

Použitá literatura

1. Jeřábek J, Krčková S, Hučínová L. Rámcový vzdělávací program pro gymnázia. Výzkumný ústav pedagogický v Praze, 2007
2. Baskett P, Nolan J. Kapesní vydání doporučených postupů v resuscitaci 2005. Evropská rada pro resuscitaci, 2006
3. The European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2005

Permeabilita dentinu a její klinický význam

Michal Beneš

Spoluautor: Milan Petrisko
Školitelé: MUDr. H. Hecová, MUDr. J. Stehlíková
Stomatologická klinika FN a LFUK v Plzni

Úvod

Dentin představuje tvrdou zubní tkáň, která tvoří základ klinické korunky i kořene. Povrch dentinu v korunkové části kryje sklovina, povrch kořenového dentinu překrývá zubní cement. V korunkové i kořenové části je dentin prostoupen množstvím tubulů procházejících celou jeho vrstvou. Klinické zkušenosti a studie předpokládají, že prostupnost dentinových tubulů může přispívat k rozvoji některých poúrazových následků. Tato skutečnost již byla prokázána u fraktur zubní korunky, u poranění periodontálních vazů je předmětem diskuze.

Metodika

Cílem experimentální částí je důkaz průniku cizorodých látek srkze kořenový dentin. Pro studii bylo použito 30 jednokořenových zubů extrahovaných z ortodontických důvodů. Zuby byly rozděleny do 6 skupin (A1, A2 - bez poškození vrstvy kořenového cementu, B1, B2 - zuby s poškozenou vrstvou kořenového cementu, C1, C2 - kontrolní skupina zubů, povrch kořene až na úroveň skloviny byl překryt kompozitem). U zubů skupiny 1 byl k experimentu použit roztok erythrosinu, u zubů skupiny 2 roztok methylenové modři.U všech extrahovaných zubů byl odříznut apex kořene a vyústění kořenového kanálku bylo okonale adhezivně utěsněno. K poškození cementové vrstvy kořene u skupin B byl použit diamantový brousek v mikromotoru. Zuby všech šesti skupin byly po dobu 30 dnů umístěny v roztoku s organickým barvivem. Následovně byly kořeny zubů každé skupiny zality do bločku epoxidové pryskyřice (Spofacryl, Dental, CZ) a po ztuhnutí rozřezány diamantovou pilou (4 zuby příčně, 1 zub podélně). Průnik barviva u jednotlivých řezů byl sledován jednak makroskopicky, jednak pomocí digitálních mikrofotografických zařízení.

Výsledky

Makroskopické sledování řezů - Průnik barviva přes stěnu kořene byl nalezen u všech zubů skupin A1, A2, B1 a B2, při čemž nebyl zjištěn rozdíl v penetraci erytrosinu a methylenové modři. U zubů skupin A byl nejvýraznější rozsah zabarvení nalezen u řezů v cervikální třetině a zároveň bylo zjištěno, že penetrace barviva se směrem k apexu snižuje. V apikální třetině byl průnik barviva výrazně redukován. Z řezů v cervikální krajině je zřejmé, že prostupnost stěny dentinu není zcela rovnoměrná. Rozsáhlejší

barevná penetrace byla nalezena v bukoorálním směru oproti směru meziodistálnímu. U řezů skupin B byla zjištěna rozsáhlá penetrace barviva ve všech částech zubního kořene, při čemž v cervikální a střední třetině radixu barvivo zasáhlo až ke kořenovému kanálku. U řezů skupin C se zabarvení vyskytlo pouze v jednon případě, kdy barvivo v důsledku nedotatečného adhezivního připojení proniklo pod vrstvu kompozita.

Diskuze

Dentin vzhledem k jeho tubulární struktuře je propustná tkáň. V případě poškození ochranné vrstvy skloviny nebo zubního cementu musí pulpo-dentinový orgán odpovídat na řadu škodlivých faktorů, zejména na možnost průniku bakteriální infekce. Klinicky permeabilní uspořádání dentinu ovlivňuje též úspěšnost ošetření u řady terapeutických výkonů. K bakteriálnímu postižení zubní dřeně přes dentinové tubuly nedochází pouze u neošetřených kazů nebo fraktur zubní korunky, ale tento faktor je významný i v případě restorativní terapie. Po poranění závesných vazů dochází k poškození cementové vrstvy a tím je možná i kontaminace dentinových tubulů anaerobními gramnegativními mikroorganizmy, které se běžně vyskytují v zubním mikrobiálním plaku a v parodontálních chobotech.

Závěr

Naše experimentální studie prokázala možnost penetrace organického barviva do pulpy přes stěnu zubního kořene. Na základě naší experimentální práce lze předpokládat, že po poranění závěsných vazů dochází k průniku mikrobiální infekce do kořenového kanálku nejen přes foramen anatomicum, ale i přes poškozenou vrstvu cementu a dentinové tubuly.

Práce byla podpořena grantem GAUK č.18309

Použitá literatura

1. Love, R.M.: The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. Oral Microbiology Imunology, roč. 17, 2002, č. 1, s. 32-37.
2. Thaler, A., Ebert, A., Petschelt, A., Pelka, M.: Influence of tooth age and root section on dentine dye penetration. International Endodontic Journal, roč.41, 2008, č. 12, s. 1115-1122.
3. Oliver, C.M., Abbott P.V.: Entrapped air and its effects on dye penetration of voids. Endod Dent Traumato roč. l7,1991, s. 135-138.

Obsah

Predklinická a teoretická sekcia

Youssef Ghaly, Tarik Adam 12
Markéta Kostrouchová 17
Tomáš Kazda 20
Benjamín Víšek 25
Ján Varga, Martin Bujdoš 28
Anna Antošíková 34
Lukáš Řehoř 36
Miroslava Htoutou Sedláková 40
Lucia Kolenová 44
Vendula Šepsová 49
Veronika Cahová 53

Klinická sekcia

Antonín Šípek 58
Eva Foltynová 64
Josef Fontana 68
Lujza Galková 72
Lukáš Krbal 75
Martina Mišániková 77
Jan Brůha 81
Patrick Tobbia 86
Tomáš Sýkora 89
Luděk Hána, Tomáš Veleta 94
Michal Beneš 96